BAND 37, HEFT 1 NOVEMBER 1959

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 43 Abbildungen

1959
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 37 **Heft 1** *S. 1—112 Berlin 1959*

Postverlagsort Berlin

NSP RAM MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL 7 DEC 1959

INHALT

Abhandlungen

KRCZAL, H., Untersuchungen über die Verbreitung der Erdbeerblattlaus *Passerinia fragaefolii* und das Auftreten von Erdbeervirosen in der Bundesrepublik. Mit 6 Abb. 1

GOIDANICH, G., e F. FERRI, La batteriosi della canapa da *Pseudomonas cannabina* Šutić et Dowson var. *italica* Dowson. Con 6 figure 21

SANDHU, R. S., Studies on the Biogenesis of Fusaric Acid. With 7 Figures 33

ZYCHA, H., Zur Frage der Infektion beim Lärchenkrebs. Mit 7 Abb. 61

NULTSCH, W., Über den Wirkungsmechanismus von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) bei der Keimhemmung der Kartoffeln. Mit 17 Abb. 75

Besprechungen 109

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photogebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/Main, Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzes Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 28,— DM **Einzelpreis 30,80 DM**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Obstkrankheiten, Heidelberg

Untersuchungen über die Verbreitung der Erdbeerblattlaus *Passerinia fragaefolii* und das Auftreten von Erdbeervirosen in der Bundesrepublik

Von

H. Krczal

Mit 6 Abbildungen

EINLEITUNG

Die Virosen der Erdbeere sind im Ausland, vor allem in Amerika und England, seit einigen Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. In Deutschland haben diese Krankheiten erst in neuerer Zeit Beachtung gefunden. Den Nachweis für ihr Vorkommen in der Bundesrepublik brachten die Arbeiten von Schöniger und Bauer (1955), Schuch (1955), Schöniger (1956, 1958), Borchardt (1957), Domes (1957) und Weiler (1957). Der wichtigste Überträger der Erdbeerviren, die amerikanische Erdbeerblattlaus *Passerinia fragaefolii* (Cock. 1901) C. B. 1952 wurde ebenfalls in den deutschen Erdbeeranlagen ermittelt.

Hauptzweck der vorliegenden Untersuchungen war es, die derzeitige Verbreitung von *Passerinia fragaefolii* möglichst genau festzustellen und Erhebungen über das Auftreten von Erdbeervirosen in der Bundesrepublik durchzuführen. Die Ergebnisse beider Untersuchungen sollten in Beziehung zueinander gebracht werden, um unter unseren Verhältnissen die Bedeutung von *P. fragaefolii* als Virusvektor beurteilen zu können. Weiterhin waren wir bestrebt, unsere Kenntnisse über die bei uns ermittelten Virosen zu vertiefen.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Dr. K. Heinze bin ich für die Bestimmung von Blattlausmaterial, Herrn OLR. Dr. G. Schumacher für die Überlassung von Untersuchungsergebnissen über das Auftreten von *P. fragaefolii* im Raum von Bonn zu Dank verpflichtet.

MATERIAL UND METHODE

Die Erhebungen über *P. fragaefolii* wurden als sogenannte 100-Blatt-Zählungen durchgeführt (THOMAS und JACOB 1940). Hierzu wurden der jeweiligen Anlage 100 der sich gerade entfaltenden Erdbeerblätter entnommen und auf Blattlausbefall untersucht. Das junge Blattmaterial wurde gewählt, weil es neben den Stolonenspitzen den bevorzugten Aufenthaltsort der Erdbeerblattlaus darstellt.

Für die virologischen Untersuchungen stand ein insektensicheres Gewächshaus zur Verfügung. Die auf Virusbefall zu prüfenden Erdbeerpflanzen verschiedener Sorten wurden Vermehrungs- und Ertragsanlagen der wichtigsten deutschen Erdbeeranbaugebiete entnommen. Bei der Probenentnahme wurde so verfahren, daß vor allem solche Pflanzen ausgewählt wurden, die durch eine geringere Wuchskraft, Blattdeformationen oder andere krankhafte Erscheinungen auffielen. Durch diese Maßnahme sollte die Wahrscheinlichkeit, viruskranke Pflanzen zu erfassen, erhöht werden. Als Indikatoren wurden *Fragaria vesca*-Pflanzen eines in East Malling selektierten Klons und *Fragaria vesca*-Sämlinge verwendet. Das für letztere notwendige Saatgut wurde von den Pflanzen des East Malling-Klons geerntet. Das geklonte Indikatormaterial diente zur Identifizierung der festgestellten virösen Erscheinungen, die leicht zu beschaffenden Sämlinge zur Durchmusterung der eingetragenen Kulturerdbeeren. Die Wilderdbeere hat sich, seit HARRIS und KING (1942) über ihre große Empfindlichkeit gegenüber dem strawberry yellow edge und dem strawberry crinkle berichtet haben, als Indikatorpflanze bewährt und wird heute allgemein zum Nachweis von Erdbeerviren verwendet.

Die Anzucht der für die Übertragungsversuche benötigten Erdbeerblattläuse erfolgte in besonderen Gewächshauszellen auf *Potentilla anserina* L. Diese Wirtspflanze hat den Vorteil, daß auf ihr die Blattlauskulturen ohne Schwierigkeiten virusfrei gehalten werden können, weil sich diese Pflanze gegenüber den von uns in Deutschland beobachteten Viren als immun verhielt, denn *P. anserina* blieb nach Besetzung mit virusinfizierten Läusen immer virusfrei, wie durch Rückübertragungsversuche auf *Fragaria vesca* gezeigt werden konnte. Bei der Durchführung der Übertragungsversuche wurden zunächst virusfreie Erdbeerblattläuse zur Viusaufnahme auf die zu prüfenden Pflanzen gebracht und dann nach Ablauf der Infektionssaugzeit auf die Indikatorpflanzen umgesetzt. Das geschah mit Hilfe von feinen, etwas angefeuchteten Pinseln. Um ein Entkommen der Tiere während der Infektions- und der Testsaugzeit zu verhindern, wurden über die Pflanzen Käfige gestülpt. Sie bestanden aus einem mit Gaze und Cellophan bezogenen Drahtgestell und hatten den Vorteil, daß sich in ihnen kein den Versuch störendes Kondenswasser bildete, auch dann nicht, wenn die Saugzeiten sehr lang waren. Im Gegensatz zu anderen Vorrichtungen, die nur über einzelne Teile der Pflanze gestülpt werden, konnten sich die Blattläuse unter den hier beschriebenen Käfigen frei auf den Erdbeeren bewegen und alle oberirdischen Teile besaugen. Dies könnte für den Übertragungserfolg von Bedeutung sein, wenn, wie CROPLEY (1958) in Erwägung zieht, die Erreger des yellow edge und des crinkle in der Erdbeere nicht systemisch, d. h. nicht in allen ihren

Teilen vorhanden sein sollten. Nach Beendigung der Testsaugzeit wurden die Läuse auf den Indikatorpflanzen in einer besonderen Zelle durch Bespritzen mit einer 0,035%igen E 605-Emulsion abgetötet. Danach wurden die Indikatorpflanzen im Gewächshaus aufgestellt und mindestens 8 Wochen lang regelmäßig bonitiert.

Von jeder in Untersuchung befindlichen Pflanze wurden in der Regel je 10 Blattläuse auf 10 *Fragaria vesca* übertragen. Die Übertragungserfolge waren gut. Von viruskranken Quellen wurden zumeist 6 bis 8, nicht selten sogar 10 Infektionen bei *Fragaria vesca* erzielt. Als Kontrollen dienten je 10 Indikatorpflanzen, an denen virusfreie Läuse gesaugt hatten, und solche Pflanzen, die nie mit Blattläusen in Berührung gekommen waren. Während der heißesten Sommermonate wurden keine Übertragungsversuche durchgeführt. Innerhalb dieser Zeit stieg nämlich die Gewächshaustemperatur trotz der vorhandenen Berieselungs- und Schattierungsanlage so stark an (bis zu 37 °C), daß sich auf der Wilderdbeere „Hitzeflecke" (Smeets und Wassenaar 1956) bildeten, die Virussymptome vortäuschen können. Alle in Frage kommenden Gewächshausräume wurden während der Versuche routinemäßig im Abstand von etwa 14 Tagen mit Phosphorsäureestern beräuchert.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERBREITUNG DER ERDBEERBLATTLAUS

Die Erdbeerblattlaus *P. fragaefolii* war ursprünglich wahrscheinlich in Nordamerika beheimatet. In der Folgezeit wurde sie wohl von dort nach Europa, Südaustralien und Neuseeland verschleppt (Börner und Heinze 1957). In England ist ihr Auftreten erstmals 1912 durch die Beschreibung Theobalds bekannt geworden. Der gleiche Autor nennt 1926 bereits 7 Fundorte in verschiedenen Teilen Englands. Über ihr Auftreten in Frankreich wird 1933 von Balachowsky berichtet. In Deutschland haben bis in die neuere Zeit keine Untersuchungen über die räumliche Verbreitung der Erdbeerblattlaus vorgelegen; die ersten Angaben darüber finden wir bei Schuch (1955, 1957). Diese Untersuchungen führten bereits zum Nachweis von Befallsherden in Südwest- und Westdeutschland. Nicht gefunden wurde die Art in den fränkischen Anbaugebieten, im Raum von Erlangen und Bamberg, sowie in Norddeutschland, abgesehen von einem kleinen isolierten Vorkommen in den Vierlanden bei Hamburg. Um das Bild von der Verbreitung des Insekts in Deutschland zu festigen, war es notwendig, die Untersuchungen fortzusetzen.

Die von uns insgesamt durchgeführten Erhebungen erfassen 123 Beobachtungsstellen, die über die wichtigsten Erdbeeranbaugebiete der Bundesrepublik verteilt sind. Wie die Karte (Abb. 1) zeigt, sind vor allem die Erdbeeranlagen in Südwest- und Westdeutschland von *P. fragaefolii* befallen. So konnte die Blattlaus im gesamten Rheingebiet von der Schweizer bis zur holländischen Grenze nachgewiesen werden. Der Grund für den nahezu lückenlosen Befall in diesem Raum ist vielleicht darin zu suchen, daß der Schädling vom Westen her zugewandert ist und daß er hier besonders günstige Lebensbedingungen hat.

Die Erdbeerblattlaus entwickelt sich in Westeuropa fast ausschließlich anholozyklisch. Durch die damit zusammenhängende Überwinterung im mobilen Stadium ist sie während der kalten Wintermonate stark gefährdet. So berichten GREENSLADE (1940, 1941), WOOD (1950), DICKER (1952) und DE FLUITER (1954, 1955, 1956), daß in strengen Wintern die Zahl der Erdbeerblattläuse stark dezimiert wird und daß sich nach solchen Jahren die Population nur sehr langsam erholt. Demgegenüber folgen milden Wintern und einem warmen Frühjahr Perioden mit starkem *P. fragaefolii*-Befall (WOOD 1950, DE FLUITER 1954, 1955). Nach WERTH (1927) gehören der rheinische Bezirk und der Kölner Buchtkreis zu den wärmsten Gebieten Deutschlands, die sich durch milde Winter und warme Sommer mit einem zeitigen Temperaturanstieg im Frühjahr auszeichnen, klimatische Bedingungen also, die der Entwicklung der Erdbeerblattlaus förderlich sind.

Abb. 1. Verbreitung von *Passerinia fragaefolii* in der Bundesrepublik. Entnahmestellen der untersuchten Erdbeerpflanzen

Im fränkischen Anbaugebiet wurde die Erdbeerblattlaus erstmals 1957 ermittelt, und zwar in einer Anlage bei Würzburg. 1958 konnte ihr Auftreten in diesem Raum erneut bestätigt werden. Die Erdbeeranlagen um Bamberg, Erlangen und Nürnberg waren jedoch wie bei den früheren Erhebungen (Schuch 1955) frei von dem Insekt. Befallsfrei waren auch die untersuchten Erdbeerfelder im Raum von Hannover, Celle, Braunschweig, Lüneburg und Elmshorn. Auch in Hessen und Nordrhein-Westfalen wurden, vor allem im Nordosten dieser Länder, befallsfreie Erdbeeranlagen gefunden. In den Vierlanden, wo die Erdbeerblattlaus 1955 zum ersten Male festgestellt worden war, wurde das Auftreten der Laus 1957 erneut bestätigt. Während aber 1955 die Befallsstärke sehr gering war und auf dreimal 100 Blättern nur eine Laus, bei einer zweiten Zählung im gleichen Jahr 6 Tiere auf 100 Erdbeerblättern ermittelt wurden, konnten 1957 am 21. 8. in Kirchwerder auf 100 Blättern der Sorte Oberschlesien 71 und auf der Sorte Senga Sengana sogar 315 Tiere der gesuchten Art gezählt werden. Dieser Befund in den Vierlanden war alarmierend, weil bei der vorgefundenen starken Population die Gefahr besteht, daß die Laus auf das umliegende noch freie Gebiet abwandert. Mit Rücksicht auf die große Bedeutung dieses Herdes für den norddeutschen Raum wurden auch 1958 in den Vierlanden Zählungen durchgeführt, wobei *P. fragaefolii* in mehreren Gemarkungen auf der Erdbeere nachgewiesen wurde (Abb. 2). Der zahlenmäßig stärkste Befall war in Kirchwerder mit 90 und 138 Tieren auf je 100 Blatt der Sorte Senga Sengana zu verzeichnen. Demgegenüber waren die Befallszahlen der anderen Stellen mit 1 bis 13 Tieren je 100 Blatt gering. Um eine vielleicht inzwischen erfolgte Ausweitung des Herdes festzustellen, wurden auch einige Zählungen in dem an die Vierlande grenzenden Gebiet durchgeführt. Sie verliefen nördlich der Vierlande negativ, südlich ergaben sich jedoch vier neue Fundstellen mit allerdings sehr schwachem Besatz (Abb. 2). Im Höchstfall wurden auf 100 Blättern 5 *P. fragaefolii* gefunden. Diese Feststellungen zeigen, daß der Herd in den Vierlanden bereits ein Ausstrahlungsgebiet besitzt, eine Tatsache, die mit Rücksicht auf die bis jetzt noch freien Vermehrungsbetriebe im Lüneburger Raum und auf der holsteinischen Geest sehr bedenklich stimmt und dringend Abwehrmaßnahmen angezeigt sein läßt.

Abb. 2. Verbreitung von *Passerinia fragaefolii* in den Vierlanden bei Hamburg.
⊕ Fundort von *P. fragaefolii*
⊖ *P. fragaefolii* nicht gefunden

Für die im übrigen Bundesgebiet durchgeführten 100-Blatt-Zählungen werden nur einige Beispiele aufgeführt. Sie sollen einen Eindruck darüber vermitteln, innerhalb welcher Grenzen die Befallszahlen schwankten.

Tabelle 1
Beispiele für einige 100-Blatt-Zählungen im Bundesgebiet

Fundort	Datum	Sorte	Zahl der Erdbeerblattläuse auf 100 Blättern
Reichelsheim	20. 10. 56	Madame Moutôt	1435
Engers, Kr. Neuwied	2. 8. 57	Regina	162
Würzburg	5. 8. 57	Howard	144
Sasbachwalden, Kr. Bühl .	5. 10. 57	Madame Moutôt	853
Ringelbach über Achern .	2. 10. 57	Regina	657
Kirchbrombach (Odw.) ...	15. 10. 57	Madame Moutôt	939
Brühl bei Köln	21. 5. 58	Roter Elefant	1197
Säckingen (Rhein)	25. 9. 58	Senga Sengana	137
Heilbronn (Neckar)	29. 9. 58	Regina	2
Beckum (Westfalen)	29. 9. 58	Senga Sengana	11
Letmathe (Westfalen)	9. 10. 58	Senga Sengana	162
Kirchbrombach (Odw.) ..	16. 10. 58	Madame Moutôt	575

Obwohl die oben aufgeführten Befallszahlen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können, weil sie in verschiedenen Jahren in unterschiedlich alten Anlagen festgestellt wurden, zeigen sie doch, daß außer geringen und mittleren Besiedlungsdichten auch ganz erhebliche Befallsstärken auftreten können. Besonders interessant ist das Ergebnis der Zählung im Mai 1958 in Brühl bei Köln. Während in Heidelberg und im Odenwald nach dem im Februar 1958 erfolgten Zusammenbruch der Population bis Juli desselben Jahres keine Erdbeerblattläuse festgestellt werden konnten (Abb. 3), betrug bei Köln der Befall bereits im Mai 1958 1197 Tiere. Dieser rasche Populationsanstieg im Frühjahr läßt auf eine gute Überwinterung der Laus in diesem Gebiete schließen. Die dazu notwendigen Voraussetzungen sind offenbar am besten in der wärmsten Zone Deutschlands gegeben, wozu insbesondere auch die Kölner Bucht gehört.

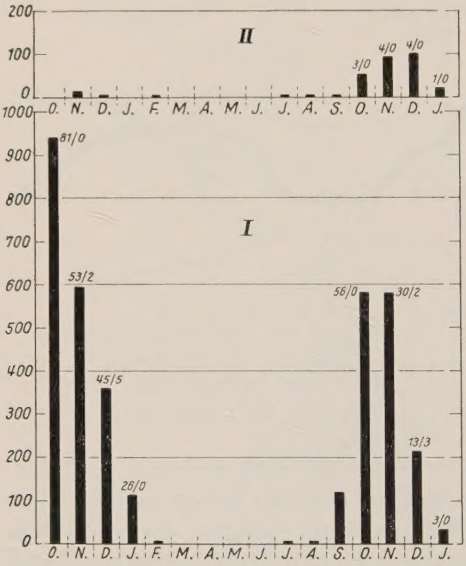


Abb. 3. Populationsverlauf von *Passerinia fragaefolii* in Kirchbrombach/Odenwald (I) und Heidelberg (II) von Oktober 1957 bis Januar 1959. Über den Säulen links vom Strich Zahl der Nymphen, rechts vom Strich Zahl der Geflügelten

Als Ergebnis der Blattlauserhebungen kann für die jetzige Situation festgestellt werden, daß *P. fragaefolii* in Südwest- und Westdeutschland allgemein in den Erdbeeranlagen verbreitet ist. In Bayern,

Hessen, Niedersachsen und Schleswig-Holstein haben wir jedoch Gebiete, in denen der Schädling bisher noch nicht gefunden worden ist. Es ist möglich, daß wir es in Deutschland mit einem alten Befall zu tun haben, dessen räumliche Ausdehnung im wesentlichen bereits durch klimatische Faktoren abgegrenzt ist. Mit Rücksicht auf die vorgeschobenen Befallsherde im Raum von Bielefeld, Büren, Würzburg und in den Vierlanden müssen wir aber vorsichtshalber damit rechnen, daß sich das Insekt auch über die bis jetzt noch freien Gebiete ausbreiten kann.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON ERDBEERVIROSEN

Ausländische Erfahrungen haben gezeigt, daß die Virusverseuchung ursprünglich gesunder Erdbeeranlagen eng mit dem Auftreten der Erdbeerblattlaus verbunden ist. So soll z. B. nach SCHUCH (1957) in England die starke Virusverseuchung der Erdbeerfelder ursächlich mit dem Auftreten und der Verbreitung der Erdbeerblattlaus zusammenhängen. In der Schweiz wurde festgestellt, daß zwischen der Zunahme des Virusbefalls und der Populationsdichte von *P. fragaefolii* eine echte Korrelation besteht. DE FLUITER (1957) kommt in Holland auf Grund seiner Untersuchungen zu gleichen Ergebnissen. Demgegenüber herrschen offenbar in Lagen, wo die Erdbeerblattlaus fehlt, günstige Voraussetzungen für die Vermehrung von virusfreiem Pflanzgut (KLINKENBERG 1947, DE FLUITER 1955). Welche Bedeutung dem Freisein von *P. fragaefolii* beigemessen wird, geht am besten aus dem Leitspruch hervor, den DE FLUITER und BESEMEER (1958) für die Erdbeeranbauer geprägt haben „Zonder knotshaarluis[1]) ook geen virusverspreiding".

Da wir in Deutschland Gebiete haben, in denen die Erdbeerblattlaus bisher noch nicht festgestellt wurde, ist es wichtig zu wissen, ob die ausländischen Erfahrungen auch für die deutschen Verhältnisse gültig sind. Aus diesem Grunde wurden Erdbeerpflanzen aus Anlagen in- und außerhalb des jetzigen Verbreitungsgebietes der Erdbeerblattlaus eingetragen und im Gewächshause einem Virustest unterzogen. Hierbei wurde *P. fragaefolii* als Vektor verwendet. Die Infektionssaugzeit betrug 4 Tage, die Testsaugzeit 10 Tage[2]).

In erster Linie interessierte uns der Gesundheitszustand der Pflanzen aus Vermehrungsbetrieben, weil diese Pflanzen bei der Erstellung von Ertragsanlagen als Pflanzgut Verwendung finden. In Tabelle 2 sind die Untersuchungsergebnisse von Pflanzen zusammengefaßt, die aus Vermehrungsbetrieben außerhalb des Verbreitungsgebietes der Erdbeerblattlaus stammen.

Tabelle 2 zeigt, daß in diesen Betrieben nur bei alten, in Deutschland schon lange im Handel befindlichen Sorten, wie z. B. Hansa, Madame Moutôt, Späte von Leopoldshall und bei den 2 ausländischen Sorten Mannevik und Auchincruive Climax eine Virusinfektion nachgewiesen werden konnte. Ein ganz anderes Bild ergab die Untersuchung von Pflanzen, die Vermehrungsbetrieben im Verbreitungsgebiet von *P. fragaefolii* entnommen wurden.

[1]) Holländische Bezeichnung für *P. fragaefolii*.

[2]) Etwa ein Drittel der Erdbeerpflanzen wurde außerdem mit Hilfe der Ausläuferpfropfung getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen mit denen der Blattlausübertragung gut überein.

Tabelle 2

Untersuchungen von Erdbeerpflanzen
aus Vermehrungsbetrieben außerhalb des Verbreitungsgebietes der Erdbeerblattlaus

Sorte	In Deutschland im Handel seit	Häufigkeit des Virusbefalls*)	Art des Befalls**)
Albritton	nicht im Handel	0/1	—
Auchincruive Climax	etwa 1953	1/5	1/0
Deutsch Evern	1902	0/5	—
Fairpeake	nicht im Handel	0/1	—
Hansa	1905	2/7	2/0
Papa Lange	1953	0/5	—
Madame Lefèbre	vermutlich ab 1920	2/2	1/1
Späte von Leopoldshall	1904	5/5	5/0
Macherauchs Frühernte	1951	0/22	—
Madame Moutôt	etwa 1911	5/5	5/0
Mannevik	1953 oder 1954	2/5	2/0
Oberschlesien	1919	0/20	—
Regina	1951	0/20	—
Mieze Schindler	1933	1/1	1/0
Senga Sengana	1954	0/28	—
Senga 54	1952	0/5	—
Prof. Dr. Settegast	1953	0/5	—
Sieger	1898	0/10	—
Georg Soltwedel	1942	0/28	—
Dir. P. Wallbaum	1953	0/5	—
Summe		18/185	17/1

*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Pflanzen; Nenner: Zahl der untersuchten Pflanzen.

**) Zähler: Zahl der an Virusisolat I erkrankten Pflanzen; Nenner: Zahl der an Virusisolat II erkrankten Pflanzen.

Hier wurden sowohl bei alten als auch bei neuen Sorten, ausgenommen Macherauchs Späternte, Virusinfektionen festgestellt.

Um das Bild abzurunden, wurden auch aus Ertragsanlagen in verschiedenen Gebieten der Bundesrepublik Pflanzen entnommen und in der gleichen Weise untersucht (Tab. 4). Die geographische Verteilung der Probeentnahmestellen (Abb. 1) läßt erkennen, daß vor allem die Ertragsanlagen im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus befallen sind. Virusinfektionen wurden dort bei alten und auch neuen Sorten wie z. B. Macherauchs Frühernte, Regina u. a. ermittelt.

Demgegenüber konnten wir, wie Tabelle 5 zeigt, in den Ertragsanlagen des von *P. fragaefolii* freien Gebietes außer bei alten Sorten keine Virusinfektion feststellen.

Obwohl mit den 539 untersuchten Pflanzen nur Stichproben erfaßt wurden, läßt sich nicht verkennen, daß die Erdbeere im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus stark virusgefährdet ist im Gegensatz zu den Gebieten, wo die Erdbeerblattlaus fehlt. Dem widerspricht auch nicht die Tatsache, daß

Tabelle 3

Untersuchungen von Erdbeerpflanzen
aus Vermehrungsanlagen im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus

Sorte	In Deutschland im Handel seit	Häufigkeit des Virusbefalls*)	Art des Befalls**)
Idun	1950	1/7	1/0
Späte von Leopoldshall	1904	7/7	4/3
Macherauchs Frühernte	1951	6/15	4/2
Macherauchs Späternte	1957	0/2	—
Madame Moutôt	etwa 1911	13/13	7/6
Mieze Schindler	1933	6/8	6/0
Oberschlesien	1919	9/10	4/5
Regina	1951	14/14	3/11
Roter Elefant	1914	5/5	4/1
Senga Sengana	1954	8/18	7/1
Senga 54	1952	4/10	0/4
Senga 188	1952	2/4	1/1
Sieger	1898	7/7	6/1
Georg Soltwedel	1942	5/10	3/2
Summe		87/130	50/37

*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Pflanzen; Nenner: Zahl der untersuchten Pflanzen.

**) Zähler: Zahl der an Virusisolat I erkrankten Pflanzen; Nenner: Zahl der an Virusisolat II erkrankten Pflanzen.

bei alten Sorten auch außerhalb des Verbreitungsgebietes der Erdbeerblattlaus Viruserkrankungen festgestellt wurden. Sie stützt sogar unsere Auffassung von der maßgeblichen Vektorrolle dieses Insekts insofern, als trotz der vorhandenen Virusquellen die Infektion auf die alten Sorten beschränkt blieb und nicht auf die Neuzüchtungen übergriff, obwohl beide oft in enger Nachbarschaft standen. Die alten viruskranken Sorten, die dort gefunden wurden, wo es noch keine Erdbeerblattlaus gibt, waren mit großer Wahrscheinlichkeit bereits infiziert, als sie in das Sortiment der betreffenden Vermehrer aufgenommen wurden. Für diese Vermutung spricht die Erfahrung, daß alte Sorten oft so stark virusverseucht sind, daß es in manchen Fällen nicht mehr möglich ist, von ihnen virusfreie Pflanzen zu finden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß bei Pflanzen der Sorte Sieger aus einem Vermehrungsbetrieb im Lüneburger Raum keine Virusinfektion nachgewiesen wurde, obwohl es sich hier um eine sehr alte Züchtung handelt. Diese Sorte wurde, wie die Nachforschungen ergeben haben, bereits 1898, dem Jahr ihrer Einführung, in das Sortiment dieses Betriebes aufgenommen und seitdem ununterbrochen aus eigenen Stammpflanzen vermehrt. Das mag die Bedeutung unterstreichen, die den Gebieten, in denen die Erdbeerblattlaus nicht auftritt, für die Erdbeervermehrung zukommt.

Rhopalomyzus ascalonicus, eine von Doncaster (1946) in England beschriebene Blattlaus, die nach den Untersuchungen von Posnette (1952) zwei nichtpersistente Erdbeerviren überträgt, tritt neuerdings auch in Deutschland in den Erdbeeranlagen auf. Ihr Vorkommen

Tabelle 4

Untersuchungen von Erdbeerpflanzen
aus Ertragsanlagen im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus

Sorte	In Deutschland im Handel seit	Häufigkeit des Virusbefalls*)	Art des Befalls**)
Auchincruive Climax	1953	0/3	—
Deutsch Evern	1902	4/9	0/4
Dithmarschen	1943	0/4	—
Idun	1950	5/10	5/0
Holstein	1948	0/6	—
Eva Macherauch	1931	0/10	—
Macherauchs Frühernte	1951	5/11	5/0
Madame Moutôt	etwa 1911	17/20	12/5
Oberschlesien	1919	32/33	29/3
Papa Lange	1953	4/9	4/0
Regina	1951	4/10	4/0
Senga 54	1952	0/7	—
Senga 146	1951	0/7	—
Sieger	1898	10/10	6/4
Georg Soltwedel	1942	4/9	1/3
Triumph	1949	3/6	3/0
Sorte der untersuchten Pflanzen nicht bekannt		12/15	9/3
Summe		100/179	78/22

*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Pflanzen; Nenner: Zahl der untersuchten Pflanzen.

**) Zähler: Zahl der an Virusisolat I erkrankten Pflanzen; Nenner: Zahl der an Virusisolat II erkrankten Pflanzen.

Tabelle 5

Untersuchungsergebnisse von Erdbeerpflanzen
aus Ertragsanlagen außerhalb des Verbreitungsgebietes der Erdbeerblattlaus

Sorte	In Deutschland im Handel seit	Häufigkeit des Virusbefalls*)	Art des Befalls**)
Macherauchs Frühernte	1951	0/5	—
Madame Lefébre	vermutlich ab 1920	5/5	4/1
Madame Moutôt	etwa 1911	5/5	4/1
Oberschlesien	1919	1/5	0/1
Regina	1951	0/5	—
Senga 29	1951	0/5	—
Senga Sengana	1954	0/12	—
Sorte der untersuchten Pflanzen nicht bekannt		0/3	—
Summe		11/45	8/3

*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Pflanzen; Nenner: Zahl der untersuchten Pflanzen.

**) Zähler: Zahl der an Virusisolat I erkrankten Pflanzen; Nenner: Zahl der an Virusisolat II erkrankten Pflanzen.

wurde von BORCHARDT (1958) im Bereich des Pflanzenschutzamtes Hannover, von uns im Rheingebiet nachgewiesen. Als Vektor von Erdbeerviren scheint sie jedoch in Deutschland keine Rolle zu spielen. Eigene Untersuchungen mit 160 *Fragaria vesca* als Testpflanzen und mehr als 1500 Tieren der genannten Art ergaben bei Verwendung unserer Virusisolate keine Übertragungserfolge.

UNTERSUCHUNG DER ERDBEERVIROSEN

In unseren Erdbeeranlagen kommen in der Hauptsache zwei Typen von virösen Erkrankungen vor, die bei den in Deutschland angebauten Kultursorten der Erdbeere keine spezifischen Symptome verursachen und darum bei einer Feldbegehung nicht mit Sicherheit erkannt werden können. Die erste dieser beiden, in den Tabellen 2—5 als Virusisolat I bezeichnet, ist am häufigsten vertreten. Bei künstlich infizierten *Fragaria vesca*-Pflanzen ist der Krankheitsverlauf folgendermaßen: Nach einer Inkubationszeit von etwa 18 bis 21 Tagen, erscheinen auf den jüngsten Blättern kleine, deutlich begrenzte chlorotische Flecke, die während des Wachstums der Blätter größer werden, aber an Deutlichkeit verlieren. Voll entwickelte Blätter weisen eine Scheckung auf, die dadurch entsteht, daß Teile der Blattspreite heller oder dunkler grün gefärbt sind. Die Grenzen zwischen diesen Stellen sind verwischt. Die Blätter sind oft leicht gewellt, vor allem am Blattrand, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, daß die unterschiedlich gefärbten Stellen verschieden stark wachsen. Die Blätter behalten jedoch in der Regel weitgehend ihr normales Aussehen und sind nur wenig kleiner als bei gesunden Pflanzen. Die Blattstiele sind nur wenig kürzer, und die Ausläuferbildung ist kaum gehemmt (Abbildung 4)[1]). Blattdeformationen, wie ungeteilte Blattspreiten, sind selten.

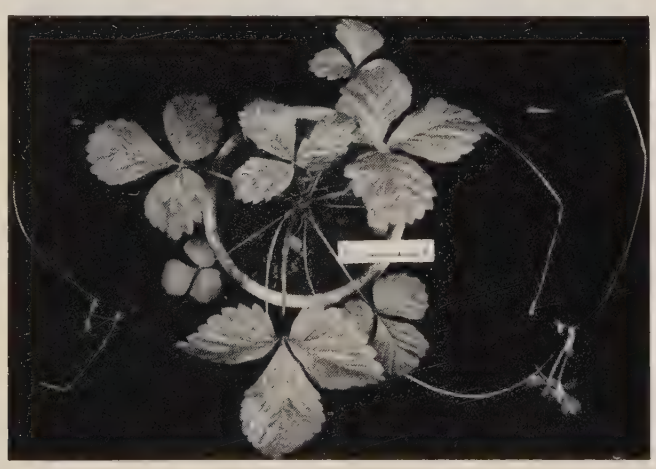


Abb. 4.
Fragaria vesca L. mit Virusisolat I infiziert

Die zweite Virose, in den Tabellen 2—5 als Virusisolat II bezeichnet, trat weniger häufig in den Erdbeeranlagen auf. Die Inkubationszeit beträgt für dieses Isolat bei *Fragaria vesca* etwa 8 bis 14 Tage. Die ersten Symptome erscheinen an den jüngsten, sich gerade entfaltenden Blättern als kleine un-

[1]) Die beschriebenen Symptome kommen in der Abbildung nicht ganz zum Ausdruck, weil sie fotografisch schwer zu erfassen sind.

regelmäßige chlorotische Flecke. In manchen Fällen kommt es aber schon sehr früh zu einer Verkräuselung der Blattfläche und einer Aufhellung der Adern. Im weiteren Verlauf der Krankheit werden die Symptome deutlicher. Die Blattstiele der neugebildeten Blätter bleiben um etwa ein bis zwei Drittel kürzer und die Blätter kleiner als bei gesunden Pflanzen. Durch verschiedenartige Deformation verlieren die Blätter mehr und mehr ihre normale Form. So treten z. B. schmale, lineare Fiederblättchen auf, bei denen die Blattrandzahnung vor allem an den Seitenrändern verlorengegangen ist. Häufig sind auch die Blattfiedern verschieden groß, oder die Blätter sind vollständig ungeteilt. Daneben treten Blattverkräuselungen und Verfärbungen in verschieden starkem Maße auf. Ferner kann man oft beobachten, daß sich die Ränder einzelner Blattfiedern entweder nach oben oder nach unten krümmen, was zur Folge hat, daß die betreffenden Blätter napfförmig gewölbt erscheinen. Auf diese Weise entstehen Pflanzen, die kaum noch ein normal ausgebildetes Blatt besitzen, wenn die vor der Infektion vorhandenen Blätter abgestorben sind (Abb. 5). Die Ausläuferbildung ist bei dieser Art der Erkrankung stark gehemmt.

Abb. 5.
Fragaria vesca L. mit Virusisolat II infiziert

Die für die beiden Isolate in ihrer typischen Form beschriebenen Krankheitssymptome können in ihrer Ausprägung in gewissen Grenzen variieren, so scheinen z. B. die Erkrankungen bei tieferen Temperaturen milder zu verlaufen als bei etwas höheren.

Um zu ermitteln ob die beiden Viruserkrankungen der Erdbeere durch persistente oder nichtpersistente Viren verursacht werden, wurden einige Versuche durchgeführt, die Aufschluß darüber geben sollten, wie lange die Erdbeerblattlaus nach einmaliger Aufnahme dieser Viren Überträger bleibt. In einem Vorversuch wurde eine Anzahl Läuse der Art *P. fragaefolii* auf *Fragaria vesca*-Pflanzen gesetzt, an denen die Symptome der als Isolat II bezeichneten Virose ausgebildet waren. Nach einer Infektionssaugzeit von 24 Stunden wurden die Läuse von den Infektionsquellen abgesammelt, in 10 Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt und auf 10 virusfreie *Fragaria vesca* übertragen. Auf diesen Pflanzen verblieben sie 24 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde jede Gruppe auf eine weitere Testpflanze umgesetzt und auf dieser nach einer Testsaugzeit von 14 Tagen durch Bespritzen mit

einer 0,035 %igen E 605-Emulsion abgetötet. In diesem Versuch erkrankten von den ersten 10 *Fragaria vesca*-Pflanzen 9 Stück. Die Symptome stimmten mit denen der Infektionsquellen überein. Die Testpflanzen der zweiten Gruppe blieben alle gesund. Somit zeigte dieser Versuch, daß die Persistenz des Erregers dieser Virose 24 Stunden nicht übersteigt.

Um zu einem noch genaueren Ergebnis zu kommen, wurde ein weiterer Versuch in der Weise durchgeführt, daß die Blattläuse nach einer Infektionssaugzeit von 24 Stunden wiederum in Zehnergruppen auf virusfreie *Fragaria vesca*-Pflanzen gebracht und dann jeweils nach einer Stunde auf eine neue Indikatorpflanze umgesetzt wurden. Dieser Vorgang wiederholte sich in jeder Versuchsreihe bis zur zehnten Testpflanze. Auf der 11. Pflanze verblieben die Läuse 24 Stunden und auf der 12. Pflanze 14 Tage. Als Infektionsquellen dienten diesmal außer den obengenannten an Isolat II erkrankten Wilderdbeeren auch solche, die mit Isolat I infiziert waren. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6

Persistenz der Viren aus Isolat I und II in der Erdbeerblattlaus

Nr. der Testpflanze	Isolat I Reihe 1 bis 5					Isolat II Reihe 6 bis 9			
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	—	—	+	+	+	+	+
3	—	—	—	—	—	—	—	+	+
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	—	—	—	—	—	—	—	—	
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = Testpflanze erkrankt, — = Testpflanze gesund. Weitere Erläuterungen im Text.

Aus der Zusammenstellung ist zu ersehen, daß durch Isolat I nur die ersten beiden *Fragaria vesca*-Pflanzen infiziert wurden. Alle übrigen, vor allem die 11. und 12. Pflanze jeder Reihe blieben gesund. Bei Isolat II erkrankten im Höchstfall die ersten drei Indikatoren. Alle übrigen blieben wie vorhin unbefallen. Das Reaktionsbild der infizierten Testpflanzen stimmte mit dem der entsprechenden Infektionsquellen überein.

Aus diesen Versuchen kann gefolgert werden, daß beide Virosen durch nichtpersistente Viren hervorgerufen werden. Im ersten Falle gelingt eine Übertragung nur innerhalb der ersten beiden Stunden, im zweiten Falle nur innerhalb der ersten drei Stunden nach der Virusaufnahme durch den Vektor.

Nach Ablauf der genannten Zeitspannen muß die Laus erneut an infizierten Pflanzen saugen, um wieder infektionstüchtig zu werden.

Versuche mit Infektions- und Testsaugzeiten von 24 Stunden, 1 Stunde und 30 Minuten Dauer ergaben ferner, daß für die Aufnahme und Abgabe der Viren beider Isolate durch *P. fragaefolii* eine Saugzeit von 30 Minuten ausreichend ist (Tab. 7).

Tabelle 7

Übertragungsversuche
mit kurzen Infektions- und Testsaugzeiten

Übertragungsbedingungen		Isolat I*)	Isolat II*)
Isz 30 Min.	Tsz 24 Std.	1/15	3/15
Isz 1 Std.	Tsz 24 Std.	3/15	1/15
Isz 24 Std.	Tsz 30 Min.	10/15	12/12
Isz 24 Std.	Tsz 1 Std.	7/15	15/15

Isz = Infektionssaugzeit, Tsz = Testsaugzeit.
*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Testpflanzen; Nenner: Zahl der Testpflanzen im Versuch.

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, daß die Übertragungserfolge mit der Zunahme der Dauer der Infektionssaugzeit größer werden. Die längere Testsaugzeit scheint dagegen im Rahmen der geprüften Zeiten keinen so großen Einfluß auf den Übertragungserfolg zu haben.

Außer der Persistenz und der Aufnahme- sowie der Abgabezeiten, wurde auch die Wärmeempfindlichkeit dieser Viren untersucht. Wir bedienten uns hierbei der Methode, die von POSNETTE (1953) und POSNETTE, CROPLEY und ELLENBERGER (1953) zur Inaktivierung von Erdbeerviren eingeführt wurde.

Für unsere Versuche stand eine Kammer von etwa 0,5 cbm Inhalt zur Verfügung, die zur besseren Isolation mit doppelten Glaswänden ausgestattet war. Die Erwärmung der Luft erfolgte in ihr mit Hilfe einer Heizmatte und wurde durch ein Kontaktthermometer gesteuert. Für den Versuch wurden fünf Pflanzen der Sorte Madame Moutôt ausgewählt, von denen zwei mit Virusisolat I und drei mit Isolat II infiziert waren. Die Behandlungsdauer betrug 8 Tage bei einer Temperatur von 37 °C ± 1 °C. Nach erfolgter Behandlung wurden die Pflanzen zweimal mit Hilfe von *P. fragaefolii* auf Virusbefall getestet. Das erstemal 2 Tage, das zweitemal 3 Wochen nach der Wärmebehandlung. Die Infektionssaugzeit betrug 24 Stunden, die Testsaugzeit 5 Tage. Von jeder Quelle wurden insgesamt 100 Erdbeerblattläuse auf 10 *Fragaria vesca* übertragen. Für die erste Rückübertragung saugten die Läuse nur an Blättern, die bereits vor der Wärmebehandlung gewachsen waren, für die zweite an solchen, die sich erst nach der Wärmebehandlung gebildet hatten. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Bei keiner der Pflanzen wurde nach der Wärmebehandlung eine Virusinfektion nachgewiesen. Im Vergleich dazu ergaben Übertragungsversuche,

Tabelle 8

Wärmebehandlung
von virusinfizierten Madame-Moutôt-Pflanzen

Nr. der Infektionsquellen	Übertragung		
	vor der Wärmebehandlung*)	2 Tage nach der Wärmebehandlung*)	3 Wochen nach der Wärmebehandlung*)
F 1	10/10	0/10	0/10
F 2	9/10	0/10	0/10
A 10	8/10	0/10	0/10
A 11	7/10	während der Behandlung abgestorben	
A 12	8/10	0/10	0/10

F 1 und 2 mit Isolat I, A 10 bis 12 mit Isolat II infiziert.

*) Zähler: Zahl der positiv reagierenden Testpflanzen; Nenner: Zahl der Testpflanzen im Versuch.

bei denen unbehandelte Madame Moutôt-Pflanzen als Quellen dienten, die denselben Klonen angehörten wie die wärmebehandelten, bei den Indikatorpflanzen eindeutig Virussymptome. Die Wuchsunterschiede zwischen einer unbehandelten und einer wärmebehandelten Madame Moutôt sind auffällig, wie Abbildung 6 zeigt. Beide Pflanzen sind gleich alt und gehören demselben Klon an.

Auf Grund des Krankheitsbildes auf *Fragaria vesca*, der Inkubationszeit, der Persistenz im Vektor, den kurzen Aufnahme- und Abgabezeiten sowie der Wärmeempfindlichkeit glauben wir schließen zu dürfen, daß beide Virosen dem englischen strawberry mottle = Erdbeervirus 1 (Prentice und Harris 1946, Prentice 1948, 1952) zuzuordnen sind. Zum strawberry mottle gehören auch die von Schöniger (1956) isolierten nichtpersistenten

Abb. 6. Ergebnis der Wärmetherapie bei Madame Moutôt. Links unbehandelte, rechts wärmebehandelte Pflanze

Erdbeerviren. Sie werden auf Grund der durchgeführten Analyse von der Autorin als Stämme des Erdbeervirus 1 aufgefaßt. Die beiden von RORIE (1957) in Arkansas isolierten nichtpersistenten Erdbeerviren weisen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit dem strawberry mottle auf. Nach RORIE hat es den Anschein, daß sie mit dem von PRENTICE und HARRIS beschriebenen Erdbeervirus 1 identisch sind. Er nimmt ferner an, daß es sich bei beiden Isolaten, von denen das zweite auf den Testpflanzen stärkere Symptome verursacht als das erste, um Stämme eines Virus handelt, die jedoch nicht nahe miteinander verwandt sind, weil zwischen beiden keine Prämunität besteht.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von SCHÖNIGER und RORIE lag der Gedanke nahe, daß die von uns als Isolat I und II bezeichneten Virosen durch zwei verschieden stark virulente Stämme des Erdbeervirus 1 verursacht werden. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde ein Versuch durchgeführt, der Aufschluß darüber geben sollte, ob zwischen den beiden Isolaten eine Prämunität besteht.

Da die Erdbeerviren durch Saftverimpfung bisher nicht einwandfrei übertragen worden sind, wurden 15 *Fragaria vesca* mit je 10 *P. fragaefolii* besetzt, die vorher an Erdbeeren gesaugt hatten, die mit Isolat I infiziert waren. Nach Ausbildung der Symptome dieses Isolats wurden auf die Testpflanzen noch einmal je 10 Läuse übertragen, denen zuvor die Gelegenheit gegeben worden war, sich mit dem Erreger der als Isolat II bezeichneten Virose zu beladen. Von den so behandelten 15 *Fragaria vesca* bildeten drei die schweren Symptome des Isolats II aus. Die restlichen Pflanzen zeigten nach wie vor nur die Symptome des Isolats I. Auf Grund dieses Ergebnisses hat es den Anschein, daß sich unsere beiden Virusisolate ähnlich verhalten wie die von RORIE, d. h. daß es sich um zwei nicht nahe miteinander verwandte Stämme des Erdbeervirus 1 handelt. Bevor wir jedoch zu einem abschließenden Urteil in dieser Frage gelangen, wird es notwendig sein, einige weitere Fragen zu klären, z. B. ob die Erdbeerblattlaus beim Saugakt das Phloem ansticht. Dies ist von Bedeutung, weil nach KÖHLER (1954) eine an sich vorhandene Prämunität durchbrochen werden kann, wenn das zweite Virus bei der Superinfektion in das Phloem gelangt. Die Verteilung des zuerst übertragenen Virus in der Pflanze spielt ebenfalls eine Rolle. Wenn das erste Virus die Blätter des Wirtes nicht vollständig durchsetzt hat, ist ebenfalls eine Infektion mit dem zweiten Virus möglich, sofern es in virusfreie Zellen gelangt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das Ergebnis unseres Versuches von einem dieser Faktoren beeinflußt und dadurch eine evtl. vorhandene Prämunität in den drei genannten Fällen durchbrochen wurde.

Außer den hier beschriebenen Virosen wurden noch zwei weitere während unserer Untersuchungen festgestellt. Die erste dieser beiden, die nur in einigen Ertragsanlagen angetroffen wurde, verursachte bei *Fragaria vesca* Blattmißbildungen, Chlorosen und Nekrosen, die zweite, in mehreren Anlagen ermittelt, Adernekrosen und Verdrehungen der Fiederblättchen. Da die Untersuchung dieser beiden Erscheinungen noch nicht abgeschlossen ist, wird über sie später an anderer Stelle berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Untersuchungen über die Verbreitung von *P. fragaefolii* in der Bundesrepublik haben ergeben, daß dieses Insekt, das als aktivster Überträger der wichtigsten Erdbeerviren gilt, im gesamten Rheingebiet verbreitet ist. Nicht gefunden wurde die Art in den fränkischen Anbaugebieten um Erlangen und Bamberg sowie im Nordosten von Hessen und Nordrhein-Westfalen. In Norddeutschland wurde bisher nur ein Befallsherd in Vierlanden bei Hamburg festgestellt, der neuerdings ein kleines Ausstrahlungsgebiet auf den im Süden angrenzenden Raum besitzt. Vorsichtshalber muß damit gerechnet werden, daß sich die Laus auch über die bis jetzt noch von ihr freien Gebiete ausbreiten kann.

2. Aus Ertrags- und Vermehrungsanlagen der wichtigsten deutschen Erdbeeranbaugebiete wurden 539 Erdbeerpflanzen 28 verschiedener Kultursorten eingetragen und in einem insektensicheren Gewächshause auf Virusbefall untersucht. 230 dieser Pflanzen stammten aus Gebieten, in denen die Erdbeerblattlaus nicht auftritt, 309 aus Anlagen, die sich im Verbreitungsgebiet dieses Insekts befanden. Bei den erstgenannten Pflanzen wurde eine Virusinfektion 29mal, bei den letztgenannten dagegen 187mal nachgewiesen. Im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus gehörten die als viruskrank befundenen Erdbeeren sowohl alten als auch neuen Sorten an. Dort wo die Laus fehlt, wurden sie dagegen nur bei alten oder aus dem Ausland eingeführten Züchtungen ermittelt. Da alte Erdbeersorten erfahrungsgemäß oft stark virusverseucht sind, wird vermutet, daß die als krank befundenen alten Sorten bereits infiziert waren, als sie in das von *P. fragaefolii* freie Gebiet gebracht wurden. Die mitgeteilten Ergebnisse lassen somit erkennen, daß die Erdbeere im Verbreitungsgebiet der Erdbeerblattlaus stark virusgefährdet ist. Sie unterstreichen auch die Bedeutung, die den Gebieten, in denen die Erdbeerblattlaus nicht auftritt, für die Erdbeervermehrung zukommt.

3. In den Erdbeeranlagen wurden, abgesehen von einigen noch ungeklärten Fällen, zwei Virosen ermittelt. Die erste dieser beiden, als Virusisolat I bezeichnet, trat am häufigsten auf. Sie wurde 128mal festgestellt. Die als Virusisolat II bezeichnete Virose war weniger häufig. Sie wurde nur 59mal nachgewiesen. Für Isolat I beträgt die Inkubationszeit bei künstlich infizierten *Fragaria vesca* 18 bis 21 Tage, für Isolat II 8 bis 14 Tage. Beide Viruskrankheiten werden durch nichtpersistente Viren verursacht. Im ersten Falle gelingt eine Übertragung nur innerhalb der ersten beiden Stunden, im zweiten Falle nur innerhalb der ersten drei Stunden nach der Virusaufnahme durch den Vektor. Für die Aufnahme und Abgabe der Erreger beider Isolate durch *P. fragaefolii* ist eine Saugzeit von 30 Minuten ausreichend.

4. Fünf Pflanzen der Sorte Madame Moutôt, von denen zwei mit Virusisolat I, drei mit Virusisolat II infiziert waren, wurden einer Wärmebehandlung unterzogen. Bei keiner der Pflanzen war 3 Wochen nach der Wärmebehandlung eine Infektion mit den genannten Virosen festzustellen. Die wärmebehandelten Pflanzen waren bedeutend wüchsiger als unbehandelte Pflanzen desselben Klons.

5. Die Viren beider Isolate werden auf Grund der durchgeführten Analyse als zwei verschieden stark virulente Stämme des Erdbeervirus 1 aufgefaßt. Da jedoch in einem Prämunitätsversuch keine vollständige Abwehr von Isolat II durch Isolat I beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, daß beide nicht eng miteinander verwandt sind. Die Klärung dieser Frage bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Summary

(1) Investigations on the distribution of *P. fragaefolii* in the Federal German Republic have shown that this insect, which ranks as the most active vector of the main strawberry viruses is present in the whole of the Rhine area. The species was not found in the Franconian areas of cultivation round Erlangen and Bamberg and in the north-east of Hessen and Rhine-Westphalia. In North Germany only one infestation area has so far been established in Vierlanden near Hamburg, which has recently shown a small area of radiation into the territory towards the south. As a precaution therefore it must be assumed that the aphid may succeed in spreading over the areas that are at present free.

(2) From commercial and multiplication plantations in the main German areas of cultivation 539 strawberry plants of 28 different cultivated varieties were collected and grown in an insect-free greenhouse, where they were tested for virus infection; 230 of these plants came from areas in which the strawberry aphid does not occur, 309 from plantations in the area of occurrence of the insect. In the former group of plants virus infection was demonstrated 29 times, in the latter group however 187 times. In the area of occurrence of the strawberry aphid the strawberries that were diseased belonged both to old and new varieties. On the other hand in areas where the aphid is absent the infected plants were found only in old varieties or in cultures introduced from abroad. Since old strawberry varieties are known to be often strongly infected with virus, it is assumed that the old varieties found to be diseased had been infected with virus before they were brought to the area free from *P. fragaefolii*. The findings reported show therefore that strawberries in the zone where the strawberry aphid occurs are very much exposed to the risk of virus infection. They also emphasize the importance that the areas free from the strawberry aphid possess for multiplication of strawberries.

(3) Two virus diseases, apart from one or two cases that await full identification, have been demonstrated in the strawberry plantations. The first of these, designated virus isolate I, occurs most frequently. It was found 128 times. The disease designated virus isolate II was less frequent. It was found only 59 times. The incubation time in artificially infected *Fragaria vesca* is 18—21 days for isolate I and 8—14 days for isolate II. Both diseases are caused by nonpersistent viruses. In the former case transmission can be effected only within the first two hours after the virus has entered the

vector, in the second case only within the first three hours. For absorption and transmission of the causal agent of both isolates by *P. fragaefolii* a feeding time of 30 minutes is sufficient.

(4) Five plants of the variety Madame Moutôt, of which two had been infected with virus isolate I and three with virus isolate II, were subjected to heat treatment. In none of the plants was any infection with either of the viruses in question detectable after 3 weeks from the heat treatment. The treated plants were condiserably more vigorous in growth than untreated plants of the same clone.

(5) The viruses of both isolates were, on the basis of the analysis reported, regarded as 2 strains of strawberry virus 1, differing in virulence. Since however in a preimmunity test no complete protection from isolate II was conferred by isolate I, it can be assumed that the two strains are not closely related. The solution of this question however requires further investigations.

Literaturverzeichnis

Balachowsky, A., 1933: I. Sur la présence en France de *Capitophorus fragaefolii* Ckll. Aphide nouvellement introduit et nuisible au Fraisier. II. Sur l'existence de nouveaux foyers d'*Aphis forbesi* Weed. Rev. Path. veg., Ent. agric. France **20**, 256—267.

Borchardt, G., 1957: Der Nachweis von Viruskrankheiten und seine Bedeutung für den Pflanzenbau. Festschr. Pfl.schutzamt Hannover, Landw.-Kammer Hannover H. 3, 72—81.

— —, 1958: Über das Freilandvorkommen und die Überwinterung von *Myzus ascalonicus* Doncatser. Nachr.bl. dtsch. Pfl.schutzd., Braunschweig, **10**, 9—10.

Börner, C., und K. Heinze, 1957: *Aphidina — Aphidoidea.* In: Sorauer, Handb. der Pfl.krankh., 5. Aufl., **5**, 1—402.

Cropley, R., 1958: Erratic transmission of strawberry viruses by grafting excised leaves. Ann. Rep. E. Malling Res. Sta. 124—125.

Dicker, G. H. L., 1952: The biology of the strawberry aphid, *Pentatrichopus fragaefolii* (Cock.), with special reference to the winged form. J. hortic. Sci., London, **27**, 151—178.

Domes, R., 1957: Eine Abbauerscheinung bei der Erdbeersorte Madame Moutôt. Phytopath. Z. **31**, 113—122.

Doncaster, J. P., 1946: The shallot aphis, *Myzus ascalonicus* sp. n. (*Hemiptera, Aphididae*). Proc. R. ent. Soc. London (B) **15**, 27—31.

Fluiter, H. J. de, 1954: Phaenologische waarnemingen betreffende de aardbeiknotshaarluis, *Pentatrichopus fragaefolii* Cock., in Nederland. Ent. Ber., Amsterdam, **15**, 94—98.

— —, 1955: Aardbeiviren en richtlijnen voor het virusvrij maken en virusvrij houden van plantenmaterial. Meded. Dir. Tuinbouw, Wageningen, **18**, 449—458.

— —, 1956: Virusziekten van aardbeien. Tuinbouwkundig onderzoek, Jaarverslg. 1956, 220.

— —, 1957: Aardbeiknotshaarluis en virusverspreiding. T. Plantenziekten **63**, 26.

— —, en A. F. H. Besemer, 1958: De bestrijding van de aardbeiknotshaarluis en de belangrijkste aardbeivirussen. De Fruitteelt **48**, 332—333.

Greenslade, R. M., 1941 a: Strawberry aphis and the weather in 1940. Ann. Rep. E. Malling Res. Sta., 65—66.

— —, 1941 b: The Migration of the strawberry aphis *Capitophorus fragariae* Theob. J. Pomol., Hortic. Sci. **19**, 87—106.

Harris, R. V., and M. E. King, 1942: Studies in strawberry virus diseases V. The use of *Fragaria vesca* L. as an indicator of yellow edge and crinkle. J. Pomol., hortic. Sci. **19**, 227—247.

Klinkenberg, C. J., 1947: Het onderzoek van bladluisen op aardbeien. Meded. Dir. Tuinbouw, Wageningen, **10**, 214—215.

Köhler, E., 1954: Viruskrankheiten. Allgemeiner Teil. In: Sorauer, Handb. d. Pfl.krankh., 6. Aufl., **2**, 1—132.

Posnette, A. F., 1952: New vectors of strawberry viruses. Nature **169**, 837—838.

— —, 1953: Heat inactivation of strawberry viruses. Nature **171**, 312.

— —, R. Cropley and C. R. Ellenberger, 1953: Progress in heat treatment for strawberry virus diseases. Ann. Rep. E. Malling Res. Sta., 128—130.

Prentice, J. W., 1948: Resolution of strawberry virus complexes. II. Virus 2 (mild yellow-edge virus). Ann. appl. Biol. **35**, 279—289.

— —, 1952: Resolution of strawberry virus complexes. V. Experiments with viruses 4 and 5. Ann. appl. Biol. **39**, 487—494.

— —, and R. V. Harris, 1946: Resolution of strawberry virus complexes by means of the aphis vector *Capitophorus fragariae* Theob. Ann. appl. Biol. **33**, 50—53.

Rorie, F. G., 1957: Resolution of certain strawberry viruses by the aphid vector *Capitophorus minor* Forbes. Plant Dis. Reptr. **41**, 683—689.

Schöniger, G., 1956: Erdbeervirosen in Deutschland. II. Isolierung nicht persistenter Viren aus einigen Kultursorten. Phytopath. Z. **26**, 111—123.

— —, 1958: Erdbeervirosen in Deutschland. III. Das Erdbeer-Nekrose-Virus, ein weiteres nichtpersistentes Virus. Phytopath. Z. **32**, 324—334.

— —, und R. Bauer, 1955: Erdbeervirosen in Deutschland. I. Befund nach Pfropfung verschiedener Sorten auf *Fragaria vesca* L. Phytopath. Z. **24**, 443—454.

Schuch, K., 1955: Einiges über die Erdbeerblattlaus *Pentatrichopus fragaefolii* Cock. Z. Pfl.krankh. **62**, 581—588.

— —, 1957: Viruskrankheiten und ähnliche Erscheinungen bei Obstgewächsen. Mitt. Biol. Bundesanst., Berlin-Dahlem, H. 88, 1—96.

Smeets, L., and L. M. Wassenaar, 1956: Problems of heat spot in *Fragaria vesca* L. when indexing strawberry selections for viruses. Euphytica **5**, 51—54.

Theobald, F. O., 1912: A new strawberry aphis. Entomologist **45**, 223—224.

— —, 1926: The plantlice or aphididae of Great Britain. London, **1**, 1—372.

Thomas, J., and F. H. Jacob, 1940: The strawberry aphis — *Pentatrichopus* (*Capitophorus*) *fragariae* Theob. With notes on *P. potentillae* Walk. and *P. tetrarhodus* Walk. Ann. appl. Biol. **27**, 234—247.

Weiler, N., 1957: Beitrag zur Verbreitung der Erdbeerblattlaus *Pentatrichopus fragaefolii* Cock. im Erdbeeranbaugebiet Hessen-Nassau. Anz. Schädl.kunde **30**, 107—109.

Werth, E., 1927: Klima und Vegetationsgliederung in Deutschland. Mitt. Biol. Reichsanst., H. 33, 1—40.

Wood, C. A., 1950: The strawberry aphid, *Pentatrichopus fragariae* (Theob.), in North Wales, with special reference to the maintenance of healthy strawberry stocks in non-fruit-growing areas. J. hortic. Sci., London, **26**, 22—34.

Istituto di patologia vegetale Bologna (Italia)
Direttore: Prof. G. Goidanich

La batteriosi della canapa da *Pseudomonas cannabina* Šutić et Dowson var. *italica* Dowson

di

G. Goidanich e F. Ferri

con 6 figure

Da alcuni anni ci stiamo occupando di questa apparentemente nuova malattia della canapa, la cui attività ha destato sì grandi preoccupazioni tra i produttori della pianta tessile ed ha contribuito a rendere più rapido il suo tracollo nell'interessamento degli agricoltori e dell'industria, in Italia.

Abbiamo detto «apparentemente» nuova, in quanto documenti obiettivi della sua esistenza in tempi andati non se ne hanno. La batteriosi descritta più di mezzo secolo or sono da Peglion non ha con quella attuale — per parere dello stesso A. espresso privatamente ad uno di noi — parentela nè sintomatologica nè eziologica. Il Prof. Peglion anzi ritiene che i casi da lui studiati avrebbero avuto bisogno di ulteriori indagini per stabilire se veramente la forma batterica in essi rinvenuta aveva responsabilità primaria o secondaria nel quadro patologico rilevato allora.

Accenni della batteriosi d'oggigiorno — quella che tra breve succintamente descriveremo — sembra possano farsi risalire ai primi anni di questo dopo-guerra: od almeno da allora datano, secondo i coltivatori ed i tecnici stimatori del tiglio, le prime manifestazioni di quei difetti colturali e di produzione che si resero così evidenti e così gravi dal 1950 in poi.

Quando noi fummo interessati alla questione predominava l'opinione che si trattasse di attacchi di anguillule o di una forma di infezione virale. In effetti la sintomatologia della nuova malattia ricordava molto, nelle sue fasi conclusive, le caratteristiche degli effetti del *Ditylenchus* o di certe affezioni da virus ad azione necrotizzante.

Coi mezzi messi a nostra disposizione dal Consorzio Nazionale Canapa e dell'Associazione Produttori Canapa abbiamo potuto affrontare lo studio della malattia con la dovuta larghezza, riuscendo in un relativamente breve volger di tempo ad allontanare dal campo gran parte delle erronee interpretazioni di cui era ingombro e quindi a raccogliere sulla nuova entità patologica un corredo, che riteniamo sufficiente, di conoscenze sulle sue caratteristiche sintomatologiche, eziologiche ed epidemiologiche. Conoscenze

che sono la base per orientarsi, sia da un punto di vista sperimentale che da quello applicativo, nella prevenzione o nella lotta contro la epifitia: ciò che rappresenta il termine finale della nostra attività ed il punto su cui particolarmente insistono le sollecitazioni che ci giungono sia dai coltivatori e sia dagli Enti che sulla nostra opera fanno affidamento.

Considerando, con oggi, così conclusa la prima fase delle nostre indagini desideriamo darne un resoconto panoramico, riunendo le indicazioni già rese di pubblica ragione con le note di QUAGLIA (1957), FERRI (1957 a, b) ed altre di recentissima acquisizione ancora inedite.

Nell'occasione vogliamo anche esprimere il nostro animo grato al dr. W. J. DOWSON dell'Università di Cambridge in Inghilterra, che ci ha dato, con la sua nota competenza in campo batteriologico, preziosi consigli nel corso delle nostre ricerche e che ha provveduto all'identificazione definitiva del ceppo del patogeno da noi isolato.

Sintomatologia

La sintomatologia di questa malattia ha manifestazioni alquanto diverse a seconda dello stadio di sviluppo raggiunto dalla pianta al momento in cui viene colpita ed a seconda delle caratteristiche di densità e di semina della coltura. In generale, negli appezzamenti a densità normale, i primi segni di essa iniziano ad apparire quando le piante hanno raggiunto l'altezza di 70—90 cm., mentre nelle colture a semina rada e sulle piante adibite alla produzione del seme iniziano più tardi e cioè quando lo sviluppo vegetativo ha portato la pianta a due metri e più di altezza. Questo particolare andamento non è assolutamente obbligato, ma di norma, segue dette caratteristiche.

L'inizio della «striatura ulcerosa» sulle giovani piante è caratterizzato dalla formazione di tanti piccoli rigonfiamenti disposti su file ad andamento longitudinale, localizzati nelle depressioni tra costa e costa, che gradatamente ne vengono annullate. Questi piccoli sollevamenti presentano all'inizio una colorazione verde-chiara, in leggero contrasto con le parti verdi circostanti, che in un tempo successivo vira verso il bruno violaceo irregolare per la differenziazione di zone necrotiche sottoepidermiche. Col progredire dell'alterazione si ha il disseccamento dell'epidermide e la sua rottura con conseguente comparsa di ferite longitudinali di un colore giallo-chiaro e di aspetto arido. Simili striature possono occupare tutta la lunghezza del meritallo o, nei casi più gravi, estendersi anche a più meritalli. Proprio per questo motivo alla malattia è stato dato il nome di «striatura ulcerosa».

Quando l'inizio della malattia avviene sulle piante adulte che hanno ormai raggiunta l'altezza di due metri e più — o sulle eventuali ramificazioni del fusto di piante porta-seme — le sue manifestazioni consistono in maculature di forma allungata, od ellittica di colore verde scuro e di un aspetto ceroso, isolate o confluenti, localizzate in lunghi tratti del fusto. Su di esse compaiono ben presto delle piccole vescicole di 1—2 × 2—3 mm, che si riempiono del pari di un materiale mucillagginoso giallostro, che rapidamente assume una colorazione bruna. Tali vescicole in breve volger di

Figura 1. Evoluzione (da sinistra a destra) di lesioni batteriche su fusto di canapa. Dapprima la sede dell'infezione è circoscritta ed interessata da piccole vescicole appena percettibili; poi si espande su largo tratto degli internodi mentre i tessuti occupati dalle pustole (divenute frattanto più numerose e più opalescenti) necrotizzano; alla fine si hanno screpolature superficiali con conseguente comparsa di «striatura ulcerosa»

Figura 2. A sinistra: esito finale della malattia su di un fusto di canapa pronto per la macerazione.
A destra: fusti di canapa, colpiti dalla «striatura ulcerosa», che hanno subito il processo della macerazione. Gli elementi fibrosi interessati dalla malattia, fortemente imbruniti, non si distaccano l'uno dall'altro e rimangono aderenti al canapulo

tempo, a causa della pressione esercitata dal materiale mucillagginoso, si rompono e disseccano. Attorno a questo centro necrotico si ha la comparsa, poi, di un nuovo alone verde-scuro sul quale appariranno nuove pustole in tutto simili alle precedenti le quali, dopo qualche tempo, del pari essiccheranno determinando così l'allargamento della zona necrotizzata. Al centro della lesione, intanto, si vengono a formare delle piccole screpolature che tendono ad ingrandire e ad approfondire sempre più, mentre le lesioni possono confluire ed interessare parte o anche tutta la circonferenza del fusto.

Oltre allo stelo sono sede della malattia anche i piccioli e i segmenti fogliari. Sui primi si rilevano sintomi simili a quelli descritti sul fusto. Negli attacchi gravi i piccioli assumono un colore marrone-violaceo e, poco tempo dopo, un aspetto marcescente che è causa dell'essiccamento di tutta la lamina fogliare. I piccioli così alterati non si distaccano dal fusto e contribuiscono a mettere in evidenza la fisionomia particolare delle piante malate: deperienti e disseccate nella parte mediana, di aspetto normale nella loro parte terminale.

Sintomi della malattia si riscontrano anche sui lobi fogliari: si tratta di macchie irregolari a contorni decisi, rossastro-violacee, distribuite irrego-

Figura 3. Sintomi della infezione batterica sulle foglie. A sinistra: si notano le deformazioni e i parziali disseccamenti in atto. A destra: lobi fogliari con numerosissimi centri di infezione

larmente sulla lamina, isolate o confluenti e provviste di un leggero alone giallo. In casi di forti attacchi tali maculature possono interessare buona parte della superficie fogliare la quale, allora, rapidamente ingiallisce ed essicca. Quando è interessata da questa alterazione la nervatura principale, si assiste ad una progessiva deformazione dei lobi fogliari e alla loro rapida morte.

Alle descritte manifestazioni macroscopiche fanno riscontro alterazioni dei tessuti interni, che assumono le seguenti caratteristiche: sulle lesioni delle piante giovani si hanno delle estese lacune dovute al distacco degli strati epidermici le quali vengono, man mano, riempite da una sorta di cuscinetti di cellule iperidriche a seguito dell'attività proliferante degli elementi più esterni dei tessuti corticali. Questi elementi di neoformazione successivamente subiscono un rapido processo necrotico e nel mentre si viene differenziando il materiale mucillagginoso giallastro che riempie in buona parte la cavità. Il processo necrotico progredisce poi a carico degli strati di cellule sottostanti la cavità medesima e a volte raggiunge anche la zona delle fibre le quali, pur matenendo la loro integrità, assumono una colorazione marrone-bruna. Successivamente si ha la morte dello strato epidermico sovrastante la cavità e la formazione di screpolature longitudinali che lasciano intravvedere la zona alterata sottostante.

La differenziazione delle vescicole nelle lesioni sulle piante adulte avviene a seguito della formazione di un centro necrotico sottoepidermico, da cui trae origine il solito materiale mucillagginoso-giallastro che determina il sollevamento della coltre epidermica. Successivamente la necrosi progredisce inoltrandosi negli strati corticali e raggiungendo poi la zona delle fibre. Negli attacchi più gravi anche il cambio e i primi strati di cellule del legno sono sede di necrosi.

Quando, alla fine, l'epidermide sollevata muore, si vengono a creare delle piccole screpolature che gradatamente ingrandiscono allargando così la sede dell'alterazione che può raggiungere anche i 2—3 centimetri di lunghezza.

Oltre a queste zone necrotiche sottoepidermiche si possono avere anche centri di infezione nei tessuti interni. Qui, a seguito dell'attività patogena del batterio, si formano delle cavità più o meno estese che possono successivamente, per la distruzione dei tessuti sovrastanti, mettersi a contatto con l'esterno.

Il controllo della patogenicità del ceppo batterico in causa è stato realizzato sia mediante l'inoculazione di prelievi diretti da piante ammalate e sia da colture pure del batterio medesimo cresciuto in substrati agarizzati.

Nel primo caso le inoculazioni sono state eseguite praticando una leggera decorticazione sul fusto ed applicandovi sopra un poco di essudato batterico; l'esito positivo, in forma di lesioni analoghe a quelle naturali, si è avuto a cominciare da dieci giorni dopo l'inoculazione stessa.

Nel secondo caso le inoculazioni sono state fatte servendosi di sospensioni del batterio in acqua distillata od in soluzione fisiologica deposte sulla superficie di organi indenni o variamente lesionati (per puntura,

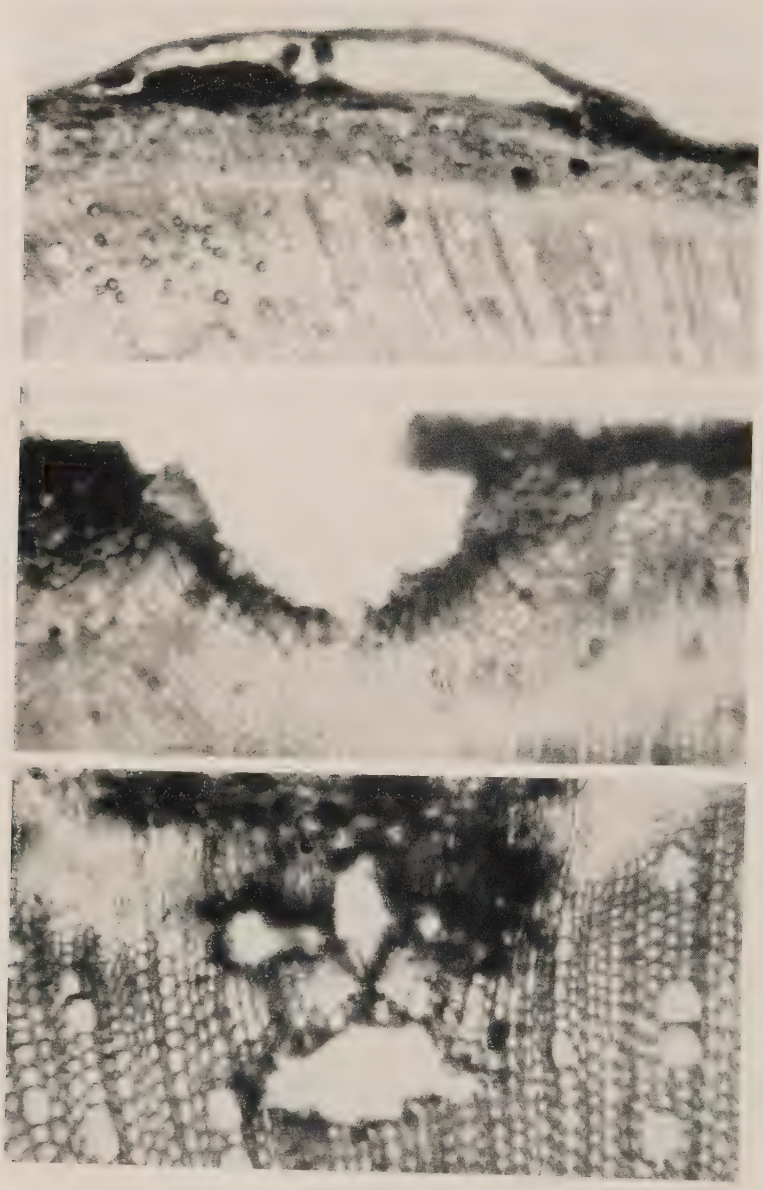


Figura 4. Dall'alto in basso:

— sezione di fusto in cui è visibile il sollevamento degli strati epidermici con formazione di una vescicola in parte ripiena di materiale batterico.

— sezione di fusto in cui il progredire della alterazione ha causato la formazione di un ampio cratere che interessa tutto lo strato corticale e parte del legno.

— sezione di fusto in cui si osservano delle lacune di origine batterica chiuse e localizzate nello spessore degli elementi xilematici

per scarificazione, ecc.). Qui l'esito è stato meno largamente positivo, e comunque solo quando si operava con materiale giovane. Evidentemente l'invecchiamento e l'allevamento su substrati artificiali attenua l'aggressività del nostro ceppo di *Pseudomonas cannabina*.

Per le caratteristiche morfologiche e tassonomiche dell'agente patogeno ci riferiamo *ad integrum* alle indicazioni forniteci da Dowson. Secondo questo Autore il nostro batterio rientra nell'orbita specifica di un'entità batterica che dal Dowson stesso e da D. Šutić è stata ritrovata dannosa alla canapa in Jugoslavia e che è stata recentemente descritta come *Pseudomonas cannabina*.

Gli elementi distintivi di tale specie si possono così riassumere: le cellule del batterio sono a forma di bastoncino con gli apici arrotondati e misurano 1,5 × 0,3 μ. Sono Gram-negativi, non sporigeni, non acido-resistenti mobili con 1-4 flagelli polari. Le colonie in agar nutritivo sono un poco convesse, con margine non sinuoso e di un colore grigio-pallido. Pro-

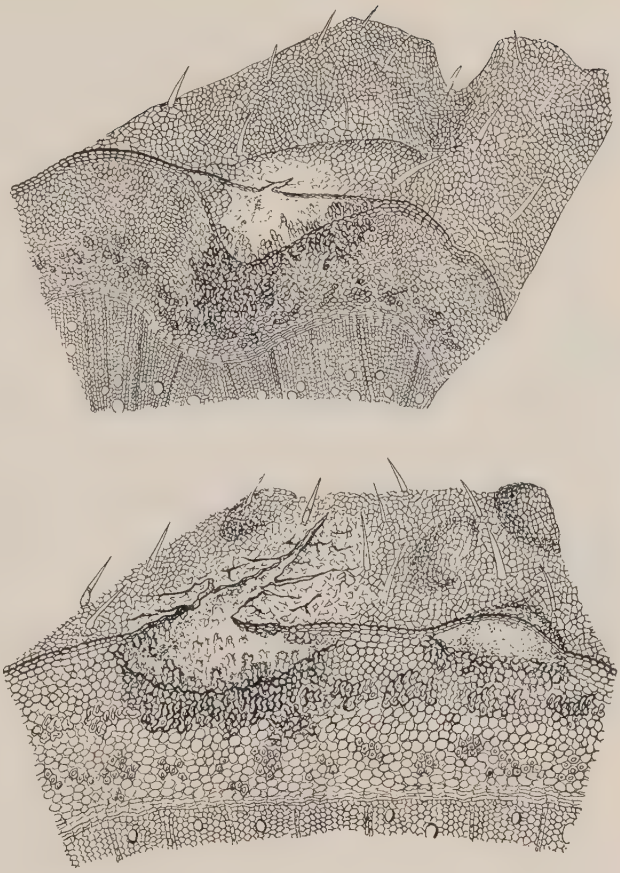


Figura 5. Sopra: sezione trasversale di fusto di canapa in corrispondenza delle lacune — originate dal distacco dello strato epidermico — fra le costolature longitudinali che vengono progressivamente riempite da ammassi di cellule iperidriche dovute all'attività proliferante degli elementi periferici del tessuto corticale. In un secondo tempo questi nuovi elementi subiscono una necrosi che si estende poi agli strati più profondi del parenchima corticale e può raggiungere anche la zona delle fibre. Come esito finale si verifica la morte del tessuto epidermico sovrastante e la comparsa di screpolature longitudinali secche.

Sotto: Sezione trasversale di un fusto di piante di canapa adulto, in corrispondenza delle lesioni batteriche. In primo piano, *a destra*, si vede una pustola superficiale determinata dal distacco degli elementi epidermici operato dalle colonie del patogeno in rapido accrescimento. In primo piano, *a sinistra*, è rappresentato lo stesso tipo di lesione in uno stadio più avanzato: gli elementi parenchimatici corticali sono in buona parte necrotizzati e il mantello epidermico è già fessurato. In secondo piano sono visibili altre lesioni vescicolari differenziatesi in prossimità della lesione primaria.

duce un pigmento bruno nell'agar e sulla superficie della gelatina che non è liquefatta. Ha uno scarso accrescimento in agar-patata che diviene bruno-chiaro, cresce nella soluzione di FERMI, non sviluppa in quella di COHN e ha un ottimo accrescimento nel brodo di glicerina. Forma acidi senza produzione di gas in xilosio, destrosio, galattosio, mannosio, saccarosio, raffinosio, e glicerina. Qualche ceppo forma acido in lattosio e in maltosio. Non si ha la formazione di acidi in mannitolo, destrine, salicina e amido. L'amido non è idrolizzato. Il latte al tornasole dapprima diviene alcalino poi acido e quindi coagula leggermente. I nitrati non sono ridotti a nitriti. Forma ammoniaca ma non produce indolo e acido solfidrico.

Figura 6. Visione microscopica dello *Pseudomonas cannabina* var. *italica* (× 600)

Tale batterio provoca delle lesioni sulle foglie in forma di maculature prima rotondeggianti poi piuttosto irregolari, cui consegue una profonda perforazione del lembo e, quindi, il distacco dei tessuti infetti.

La perpetuazione dell'infezione dovrebbe essere affidata in gran parte ai germi presenti sul seme.

Il ceppo italiano, per cui il DOWSON propone la denominazione di *Pseudomonas cannabina*, var. *italica*, sostanzialmente differisce dal tipo per produrre assai meno pigmento bruno sugli agar nutritivi e per avere uno sviluppo molto meno intenso sul brodo di glicerina.

Notevole, almeno sinora, risulta la differenza nella patogenicità: mentre il tipo infatti si limita a danneggiare le foglie, il ceppo italiano insiste particolarmente sul fusto. I limiti di questa differenziazione patogenetica verranno stabiliti con esattezza nel corso delle indagini future nostre e, come ci comunica, anche del dr. DOWSON.

Poche notizie abbiamo nel settore epidemiologico di questa batteriosi. Nonostante le indagini espressamente fatte non c'è risultato che il seme possa portare con sè l'infezione. Per cui si dovrebbe pensare alla perpetuazione dell'inoculo tramite i residui della vegetazione ammalata che restano nel terreno di coltura o che vengono trasportati a distanza da esso.

La contaminazione delle piante e la diffusione dell'infezione dai primi centri costituitisi sullo stelo o sulle foglie è molto verosimilmente operata dalle piogge che, quando le colture canapicole sono ancora giovani e rade, spesso battono assai violente; tanto che gran parte della vegetazione aerea delle piantine appare talvolta tutta ricoperta di schizzi di terra.

E poche notizie anche abbiamo per quanto riguarda la lotta. La sperimentazione che avevamo predisposto nell'anno passato non ha avuto esito a

causa della assenza della malattia. Noi programmiamo di ripeterla quest'anno colle medesime caratteristiche di impostazione: da una parte cioè vedremo di stabilire l'attività dei fitofarmaci oggigiorno disponibili e dall'altra cercheremo di individuare l'eventuale azione inibente o limitante che sullo stabilirsi e sul diffondersi dell'infezione esercitano i fattori agronomici. Come d'altronde non perderemo di vista la probabilità della esistenza di tipi di canapa, dotati di naturali doti di resistenza alla malattia.

Riassunto

Nella presente Nota è descritta una batteriosi della canapa che da alcuni anni compare sistematicamente in tutte le coltivazioni dell'Italia settentrionale. L'agente di questa alterazione è identificabile con lo *Pseudomonas cannabina* Šutić et Dowson, agente di una analoga malattia presente nelle coltivazioni jugoslave di canapa da cui, peraltro, il ceppo italiano (cui il Dowson ha attribuito la denominazione varietale di *italica)* diversifica per alcuni caratteri colturali e patogenetici.

La sintomatologia di questa malattia ha manifestazioni diverse a seconda della stadio di sviluppo raggiunto dalla pianta al momento in cui viene colpita.

Sulle giovani piante la malattia inizia con la formazione di tanti piccoli rigonfiamenti disposti su file ad andamento longitudinale, localizzati nelle depressioni tra costa e costa le quali vengono gradatamente annullate. Successivamente nei tessuti sottostanti si formano delle zone necrotiche di un colore bruno-violaceo, ad andamento lineare a cui fa seguito la rottura dell'epidermide con la conseguente comparsa di ferite longitudinali di un colore giallo-secco. Per questo motivo alla malattia è stato dato il nome «striatura ulcerosa».

Sulle piante adulte, sia nelle colture da fibra che in quelle da seme, compaiono sul fusto delle zone di forma varia (ellittiche o allungate) di un colore verde-scuro, di aspetto ceroso e isolate o confluenti. Su di esse si differenziano poi delle piccole vescicole di 1—2 × 2—3 mm che si riempiono di un materiale mucillagginoso-giallastro. Tali vescicole in breve tempo si rompono e disseccano mentre attorno a questa zona necrotica compaiono nuove pustole che causano l'allargamento della porzione alterata.

Oltre allo stelo sono sede della malattia anche i piccioli e i segmenti fogliari. Sui primi si rilevano sintomi simili a quelli descritti sul fusto, mentre sui lobi fogliari compaiono macchie irregolari, rossastro-violacee, distribuite irregolarmente nella lamina, isolate o confluenti e provviste di un leggero alone giallo. Quando è interessata dalla infezione la nervatura principale, si assiste ad una progressiva deformazione dei lobi fogliari e alla loro rapida morte.

Microscopicamente sulle lesioni delle piante giovani si osserva il sollevamento della epidermide, la formazione di cuscinetti di cellule iperidriche e successivamente la loro necrosi che prosegue fino ad interessare la zona delle fibre e il tessuto legnoso. Sulle piante adulte, nello spessore della corteccia, compare un piccolo centro necrotico in cui le cellule si disorganizzano crean-

do una cavità che si riempie di materiale batterico il quale, per pressione, causa il sollevamento degli strati sovrastanti con la formazione delle vescicole. Se il punto necrotico prende origine nei tessuti legnosi, nell'interno di questi compaiono delle cavità che possono o meno mettersi in contatto con l'esterno.

Prove di inoculazione per ferita sono state eseguite con materiale allevato in coltura e con essudato batterico prelevato direttamente dalle piante ammalate. Nel primo caso gli esiti non sempre sono stati positivi in quanto l'allevamento su substrati artificiali attenua l'aggressività del nostro ceppo; nel secondo caso invece, in tutte le inoculazioni l'esito è stato positivo e i primi sintomi sono comparsi dopo circa 10 giorni dalla inoculazione.

Poche notizie abbiamo nel settore epidemiologico; da ricerche espressamente fatte non è risultato che il seme porti con sè l'infezione per cui si dovrebbe pensare alla perpetuazione dell'inoculo tramite i residui vegetali ammalati caduti nel terreno.

Per quanto riguarda la lotta sono state impostate una serie di prove di pieno campo e di laboratorio, da effettuarsi durante la prossima annata, che prevedono l'impiego di antibiotici e di altri fitofarmaci e i cui risultati verranno pubblicati in un prossimo futuro.

Summary

In this paper a bacteriosis of hemp is described which has systematically appeared for some years in all the cultures of Northern Italy. The agent of this alteration can be identified with the *Pseudomonas cannabina* Šutić et Dowson, agent of a similar disease appearing in the Yugoslavian hemp cultures from which however the Italian strain (to which DOWSON has given the name of var. *italica*) is different in some cultural and pathogenetic characters.

The symptomatology of this disease has different manifestations according to the stage of development reached by the plant in the moment in which it is struck.

In the young plants, the disease begins with the formation of many small protuberances situated in rows with longitudinal direction, localized in the depressions between ridge and ridge, which are gradually cancelled. Later on, in the tissues below, necrotic areas of a brown-violet colour, with linear direction are formed, followed by the breaking of the epidermis with the consequent appearance of longitudinal wounds of a dry-yellow colour. For this reason the disease has been called "ulcerous striping".

In the grown up plants, both in the cultures for fibre and in the ones for seed, in the stem some areas appear of various shape (elliptical or elongated) of a dark-gray colour, of wax-like aspect and isolated or confluent. On them are then differentiated small vesicles of 1—2 × 2—3 mm. which are filled with yellowish-mucilaginous material. These vesicles break after a short time and get dry, while around this necrotic area other pustules appear which cause the enlargment of the diseased part.

Besides to the stem, also the buds and the leaf segments are the seat of the disease. In the former symptoms are found similar to those des-

cribed for the stem, while on the leaf lobes irregular spots appear, reddish-violet, irregularly distributed on the lamina, isolated or confluent and supplied with a light yellow halo. When the main vein is attacked by the infection, a progressive deformation of the leaf lobes and their quick death are observed.

Microscopically, on the lesions of the young plants one observed the raising of the epidermis, the formation of cushions of hyperhydric cells and later on their necrosis which continues until it interests the area of the fibres and the wood. On the grown-up plants, in the thickness of the bark, a small necrotic centre appears in which the cells are disorganized, thus causing a cavity which fills with bacteric material which, owing to the pressure, causes the raising of the layers above, with the appearance of vesicles. If the necrotic point has its origin in the wood, inside cavities appear which can, or cannot, be in contact with the outside.

Trials of inoculation with wounds have been made with material grown in artificial medium and with bacteric exudate taken directly from the diseased plants. In the former case the results have not always been positive, because the breeding on artificial media reduces the agressivity of our strain; in the latter case instead, in all the inoculations, the result has been positive and the first symptoms have appeared after about 10 days from the inoculation.

We have few news in the epidemiological field; from researches purposely made it has not appeared that the seed bears the infection in itself, and for this reason one should think that the perpetuation of the inoculation takes place through the vegetal diseased residues dropped on the ground.

Concerning the control, a series of trials in the field and in the laboratory has begun, to be made within next year, and it foresees the usage of antibiotics and of other pesticides, and the results of which will be published in the near future.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine seit einigen Jahren regelmäßig in den Hanfkulturen Norditaliens auftretende Bakteriose beschrieben. Als Erreger dieser Krankheit wurde *Pseudomonas cannabina* Šutić et Dowson, der Erreger einer ähnlichen Krankheit in den jugoslawischen Hanfkulturen festgestellt. Der italienische Stamm (dem Dowson die Varietätsbezeichnung „italica" gegeben hat) unterscheidet sich durch einige besondere Kultur- und Pathogenitätseigenschaften vom jugoslawischen Stamm.

Je nach dem Entwicklungsstadium der Pflanzen sind die Symptome der Krankheit etwas verschieden. Bei jungen Pflanzen beginnt die Krankheit mit der Bildung zahlreicher kleiner, in der Stengellängsrichtung in Reihen angeordneter und in den Vertiefungen zwischen den Stengelrippen lokalisierter Schwellungen, wobei die Vertiefungen zwischen den Rippen nach und nach verschwinden. In den darunter liegenden Geweben bilden sich nekrotische Zonen von dunkelvioletter Farbe; die Epidermis bricht später auf und es treten in der Längsrichtung verlaufende Wunden von tongelber Farbe auf. Die Krankheit wird demzufolge als „ulceröse Streifung" bezeichnet.

Bei den erwachsenen Pflanzen treten sowohl bei Faserkultur, wie auch bei Samenkultur auf den Stengeln verschieden geformte (elliptische oder längliche) Zonen von dunkelgrüner Farbe auf. Diese sind von wachsigem Aussehen und sie treten zuweilen zu größeren Flächen zusammen. Später differenzieren sich auf denselben kleine Bläschen von 1—2 × 2—3 mm, welche sich mit gelblichem, schleimigen Material füllen. Sie platzen nach kurzer Zeit und trocknen ab; um die nekrotische Zone herum bilden sich aber neue Pusteln und erweitern so die pathologisch veränderten Pflanzenteile.

Außer den Pflanzenstengeln werden auch die Blattstiele und Blättchen von der Krankheit erfaßt. Auf den Blattstielen zeigen sich ähnliche Symptome wie auf den Stengeln, während auf den Blattspreiten unregelmäßige, rötlich-violette Flecke in Erscheinung treten. Diese sind gegeneinander isoliert oder fließen ineinander; sie sind regellos über das Blatt verteilt und mit einem schwach gelben Rande versehen. Hat die Infektion die Hauptadern erfaßt, so deformieren die Blattspreiten und welken dann rasch.

Mikroskopisch lassen sich an den Wunden der jungen Pflanzen eine Hebung der Epidermis, die Bildung von Lagern hyperhydrischer Zellen und eine Zellnekrose feststellen. Die Nekrose vermag so weit fortzuschreiten, daß sie auch die Faserzone sowie das darunterliegende Holzgewebe erfaßt. Auf den ausgewachsenen Pflanzen tritt in der Rinde ein kleines nekrotisches Zentrum auf. Hier ist die Zellorganisation gestört und es bildet sich eine Einsenkung, die sich mit Bakterienmaterial füllt, wodurch die darüber liegenden Schichten unter Bläschenbildung emporgehoben werden. Nekrotische Stellen im Holzgewebe entwickeln sich zu Höhlen, die zuweilen nach außen durchbrechen.

Künstliche Infektionen (Wundinfektionen) wurden mit Bakterien aus Reinkulturen und mit direkt aus den kranken Pflanzen stammendem Material durchgeführt. Im ersteren Falle war der Erfolg nicht immer sicher, da die Kultur auf künstlichen Nährböden die Virulenz des Stammes verminderte. Mit der zweiten Methode waren die Resultate hingegen stets positiv; die ersten Symptome zeigten sich etwa 10 Tage nach der Infektion.

Die Versuche ergaben ferner, daß eine Übertragung der Krankheit mit den Samen ausgeschlossen ist. Es muß vielmehr angenommen werden, daß sich die Krankheit unter Vermittlung der auf die Erde fallenden Pflanzenreste überträgt.

Da die Versuche über die Bekämpfung der Krankheit noch andauern, kann darüber erst später berichtet werden.

Bibliografia

Ferri, F., 1957 a: La «striatura ulcerosa». Informatore Fitopatologico, 7, 235—238.

— —, 1957 b: La «striatura ulcerosa» flagello della canapa. Progresso Agricolo, 10, 1194—1199.

Peglion, V., 1902: La batteriosi della canapa. Rendiconti della R. Accademia dei Lincei, 10, 32—34.

Quaglia, A., 1957: Osservazioni preliminari sulla «striatura ulcerosa». Boll. Associazione Produttori Canapa, Bologna.

Šutić, D., e W. J. Dowson, 1959: An investigation of a serious disease of Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Jugoslavia. Phytopath. Z., 34, 307—314.

From the Department of Special Botany of the Swiss Federal Institute of Technology in Zurich

Director: Prof. Dr. E. Gäumann

Studies on the Biogenesis of Fusaric Acid

by

Rajindar S. Sandhu

With 7 Figures

Contents: A. Introduction. — B. Materials and Methods: 1. Materials. 2. Mycological Techniques. 3. Biochemical Techniques. 4. Radioisotopic Techniques. — C. Amino Acid Metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. in Relation to Fusaric Acid Production. — D. Studies with Pre-grown Mycelium of *Fusarium lycopersici* Sacc. — E. Studies with Pre-grown Mycelium of *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. — F. Isotopic Competition in Fusaric Acid Biosynthesis. — G. Contribution of Some C^{14}-labelled Precursors to Fusaric Acid Carbon. — H. Discussion. — Summary. — Zusammenfassung. — Literature Cited.

A. INTRODUCTION

Fusaric acid was first isolated by Yabuta, Kambe and Hayashi (1934) as the metabolic product present in the culture filtrates of *Fusarium heterosporum* Nees. As this is an unimportant fungus, found all over the world as a saprophyte or nonspecific parasite, no special attention was paid to its product for about two decades. It was left to Gäumann, Naef-Roth and Kobel (1952) to discover the real significance of fusaric acid as a wilt toxin of *F. lycopersici* Sacc., *F. vasinfectum* Atk., and *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. Since then a good amount of work has been done on its role in the wilt pathology of tomato and cotton fusarioses. As a result of these interesting studies fusaric acid was demonstrated as the first systemic vivotoxin in tomato (Kern and Kluepfel 1956) and cotton plants (Kalyanasundaram and Venkata Ram 1956). The various aspects of the biological activity of the toxin have recently been reviewed in an exhaustive way (Gäumann 1957, 1958, Kalyanasundaram and Braun 1958).

Chemically fusaric acid is defined as 5-n-butylpicolinic acid with a molecular weight of 179. Its laboratory synthesis was accomplished by

PLATTNER, KELLER and BOLLER (1954), NAKASHIMA (1955) and HARDEGGER and NIKLES (1956). The existence of dehydrofusaric acid in preparations of fusaric acid was demonstrated by STOLL (1954). More recently it has been isolated from the culture filtrates of *F. lycopersici* (STOLL, RENZ and GÄUMANN 1957) and *G. fujikuroi* (STOLL and RENZ 1957). The dehydro form has a terminal double bond in the butyl side chain. Its toxic role is close to that of fusaric acid (STOLL 1954). Many other fungi, but all belonging to the family *Hypocreaceae*, produce fusaric acid (GÄUMANN 1957). In liquid culture its production is influenced by carbon : nitrogen ratio and amino acid and Zn contents of the medium. Studies on these lines were made by KALYANASUNDARAM and SARASWATHI-DEVI (1955) and SANWAL (1956).

Fusaric acid, now being an established systemic toxin, has come to occupy a place of importance. While considerable work has already been and is being done on its pathologic and toxic actions, there is great need to look for its origin in the fungal metabolism. The latter should provide answers to many questions relating to disease resistance of the hosts and the varying pathogenicity of the different strains of the pathogens in the wilt diseases in which fusaric acid has been found to play a role. The author has made an attempt to reveal some of the metabolic pathways that lead to the production of fusaric acid by *F. lycopersici* and *G. fujikuroi* and investigations are presented in this paper.

Fusaric acid is a pyridine derivative containing one atom of nitrogen. It would therefore be logical to search for its precursors among the amino acids of the pathogen. In literature there is a suggestion that alanine and citrulline bear some precursor-relationship to fusaric acid (FLÜCK and RICHLE 1955). The idea is based on the results obtained from the semiquantitative paper chromatographic studies of still cultures of *F. lycopersici*. The author has tried to confirm these results with more elaborate quantitative methodology (Section C). The problem was approached from another side also: admitting that the above mentioned amino acids are the real precursors, their addition to the culture medium should stimulate fusaric acid production by the fungus. Various commonly occuring amino acids were studied to ascertain their influence on the fusaric acid production by pre-grown mycelia of *F. lycopersici* and *G. fujikuroi* (Sections D and E).

Two of the other pyridine derivatives of biological importance and occurrance are nicotinic acid and dipicolinic acid which plays a role in the sporogenesis of certain bacteria (FOSTER 1956). The former is synthesized from the metabolic product of tryptophane, 3-hydroxyanthranilic acid, in *Neurospora* (MEISTER 1957), but in bacteria (YANOFSKY 1955) and in higher plants (GRIMSHAW and MARION 1958) it is not biosynthesized as in *Neurospora*; real pathways however are not known. Dipicolinic acid, also structurally close to fusaric acid, comes from common metabolites like pyruvate and aspartate or from their corresponding amino and keto acids (MARTIN and

Foster 1958). It appears that the pyridine ring is evolved in more than one way in different biological systems (Grimshaw and Marion 1958). In view of the experience gained from other pyridine compounds it was thought necessary to survey a broad spectrum of amino acids in order to study their relative contribution to the fusaric acid carbon. In the present investigations it was found that one of the organisms, *G. fujikuroi*, lent itself well to isotopic studies. Using the isotopic competition technique (Abelson and Vogel 1955), inactive amino acids were fed along with active glucose (C^{14}-labelled) to the fungus. The resulting decrease in specific radioactivity of the synthesized fusaric acid was taken as a measure of the participation of the respective amino acids, or other metabolites, in the biosynthesis of fusaric acid (Section F). In the second type of isotopic experiments labelled precursors were furnished exogenously; the degree of incorporation of radioactivity into fusaric acid indicated the extent to which the respective compounds took part in the fusaric acid biosynthesis (Section G).

B. MATERIALS AND METHODS

1. Materials

Fusarium lycopersici strain ETH 5414 and *Gibberella fujikuroi* strain ETH M 82 were used throughout the present work. The fungi were maintained on malt agar at 4 °C with regular subculturing after every two months.

All the amino acids were obtained through the courtesy of F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G., Basel, Switzerland. γ-Aminobutyric acid-l-C^{14} was purchased from the California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles 63, U. S. A. All the other C^{14}-labelled substances were purchased from the Harwell Isotope Centre, England.

2. Mycological Techniques

The fungi were grown on rice for 5 days after which the conidia from one such culture were harvested by shaking it with 100 ml. of distilled water. One ml. of this spore suspension served as standard inoculum for one liquid culture of *F. lycopersici*. In the case of *G. fujikuroi* the spore suspension was incubated for 24 hours on a shaker from which 10 ml. were added to each liquid culture as inoculum. This provided vigorously growing mycelium in short time as needed for the experimental work. Fungi were grown in 500 ml. capacity Erlenmeyer flasks each containing 100 ml. of the growth medium at 27 °C in dark. *F. lycopersici* was grown in standing cultures in Richards medium with the following composition (gm. per litre of distilled water): glucose, 50; ammonium nitrate, 10; monopotassium phosphate, 5; magnesium sulphate, 2.5; ferric chloride, 0.02. The initial pH of the medium was adjusted to 4 before autoclaving. *G. fujikuroi* was grown in shake cultures on a rotary shaker at 200 rpm in Czapeks medium with the following composition (gm.

per litre of distilled water): glucose, 40; sodium nitrate, 3; monopotassium phosphate, 1; magnesium sulphate, 0.5; potassium chloride, 0.5; ferrous sulphate, 0.01. The initial pH of the medium was adjusted to 5.5 before autoclaving.

For dry weight determinations, the mycelium was filtered on SCHLEICHER and SCHUELL filter paper No. 595 and washed thoroughly before drying it for 20 hours at 70 °C and for 4 hours at 103 °C. The weight of the filter papers had been previously ascertained by the same drying procedure. Therefore the final weight minus the weight of the filter paper gave the dry weight of the mycelium.

3. Biochemical Techniques

a) Estimation of Fusaric Acid

Samples of the culture filtrate were extracted at pH 4 by repeated shaking with ethylacetate using fresh solvent each time. The total volume of the solvent used was always three times that of the sample. The ethylacetate extract was evaporated to dryness and redissolved in a known amount of 80 % ethanol for chromatographic work. Chromatograms were run on WHATMAN No. 1 paper for 10 to 12 hours in secondary butanol, formic acid and water (75 : 15 : 10 by volume). Fusaric acid had a Rf of 0.81 and showed yellow fluorescence in ultraviolet light. A light spray with DRAGENDORFF reagent gave an orange coloured spot (KLUEPFEL 1957).

For quantitative work no specific chemical test is known for estimating small amounts of fusaric acid in biological materials. There exist however methods for nicotinic acid which are based on colour reactions of the pyridine ring which both have in common. One of these is the red colour formation with p-acetophenone in the presence of cyanogen bromide (ARNOLD, SCHREFFLER and LIPSIUS 1941); when this method was tried for fusaric acid the result was negative. Utilization of this method for some other pyridine derivatives, including nicotinic and iso-nicotinic acids, β-butylpyridine, α-picoline and α-picolinic acid, revealed that all derivatives with alpha carboxylic group failed to react.

Ultimately, the author had to depend upon the method involving direct spectrophotometric measurements of eluted spots of fusaric acid from the paper chromatograms (ZÄHNER 1954). The spots marked under ultraviolet were cut into small pieces and put into test tubes containing 5 ml. of the eluent (80 % ethanol). The elution proceeded for 24 hours and tubes were shaken twice during this period. Afterwards the extinction coefficient was determined at 268 mμ and corrected for the background. The amount of fusaric acid was calculated by referring to the standard curve prepared with known amounts of the substance. The method worked well over a range of 15 to 100 μg of fusaric acid per spot.

b) Estimation of Glucose

One ml. of the sample containing 0.2 to 2.0 mg of glucose was pipetted into clean dry tubes (15 × 2 cm) graduated at 25 ml. After adjusting the volume of the sample to 3 ml. with distilled water, each tube received 1 ml. of TTC reagent (triphenyltetrazolium chloride, one percent aqueous solution) and 2 ml. of 0.5 N NaOH. After mixing, the tubes were heated in boiling water for exactly three minutes, then rapidly cooled and 2 ml. of 5.5 N acetic acid was added. The volume was adjusted to the 25 ml. mark with iso-propanol and the mixture shaken to dissolve the red formazone. The colour was read at 400 mμ and referred to the standard curve obtained from known amounts of glucose (Paech and Tracey 1955).

c) Estimation of Total Amino Nitrogen

Ten ml. of clear culture filtrate were pipetted into a 50 ml. volumetric flask and made alkaline with N NaOH using one per cent thymolphthalein as an inner indicator. To this were added 30 ml. of copper phosphate suspension which was prepared by mixing 1 vol. of 0.16 M $CuCl_2$ with 2 vol. of borate buffer (28.6 gms of sodium borate dissolved in 50 ml. of N HCl and the volume made to 700 ml. with distilled water), 2 vol. of solution containing 64.5 gms of $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ and 7.2 gms NaOH per litre. The volume in the flask was then adjusted to the 50 ml. mark, shaken and filtered through Whatman No. 5 filter paper. The copper content of the filtrate was then measured through iodometric titration which proceeded as follows: one gm of KI was added to 10 ml. of the filtrate and acidified with 0.5 ml. of acetic acid. The free iodine was titrated against 0.01 N $Na_2S_2O_3$ using starch as the indicator. Calculation for amino nitrogen was accomplished through the use of the following formula in which t stands for the volume of sodium thiosulphate used:

$$\frac{t \times 0.28}{2} = \text{mg amino Nitrogen per ml. of culture filtrate}$$

(Pope and Stevens 1939, Sanwal 1956).

d) Extraction of Free Amino Acids from the Mycelium

Mycelium from two cultures was harvested, washed thoroughly, excess water removed on a Buchner funnel and quickly mixed with 120 ml. of absolute ethyl alcohol and 30 ml. of water. The mycelium then was reduced to a paste with a glass homogenizer and left in cold for a few hours. After centrifuging 120 ml. of chloroform was added to the supernatant, which was agitated and then allowed to settle. The aqueous layer contained all the amino acids while the fatty material was removed in the chloroform-alcohol layer. The amino acid extract was evaporated under reduced pressure, redissolved in 2 ml. of 10 % iso-propanol, filtered through cotton and stored at — 20 °C. A known volume of the sample (10 to 20 μl.) was used for each chromatogram (Fuerst and Wagner 1957).

e) Extraction of Amino Acids from Culture Filtrate

Direct paper chromatography of the culture filtrate or a concentrate thereof gave poor separation of amino acids. Thus for quantitative estimation the removal of sugars and salts of the nutrient medium was found indispensable. The amphoteric nature of amino acids has widely been used for their selective adsorption on either cation or anion exchangers followed by fractional elution (LEDERER and LEDERER 1957). For desalting small fractions of amino acids obtained from column chromatography DRÈZE, MOORE and BIGWOOD (1954) used Dowex 50 and Dowex 2 with success. The autor adopted their method to desalt culture filtrates as follows; Dowex 2 (X 8, 100—200 mesh in Cl^- form) and Dowex 50 (X 8, 100—200 mesh in H^+ form) were purchased through normal commercial channels. The former is a strongly basic anion exchange resin and the latter is a sulphonated crosslinked polystyrene resin with adsorptive capacities of 3.0 and 5.0 mEq/gm respectively. The resins were washed twice with 2 N HCl and 2 N NaOH alternatively and from each separate 2.5 × 2.5 cm columns were prepared. The Dowex

Table 1

Recovery of various amino acids from RICHARD's culture medium with Dowex 2 and Dowex 50 ion exchange resins

Amino acids added	Amount of amino acid added per 10 ml. of medium	Resin used for extraction	Elution with	Recovery in percent of the original amount
Glycine	20 mg	Dowex 2*	80 ml. of 1 N acetic acid	98 to 100
Leucine	80 mg			
Citrulline	20 mg			
Tryptophane	20 mg	Dowex 50**	80 ml. of 4 N HCl	97 to 100
Arginine	20 mg			98 to 100
Glycine, Leucine, Serine, Aspartic acid, Proline — as mixture	10 mg of each	Dowex 2	80 ml. of 1 N acetic acid	95 to 98
Phenylalanine, Methionine, Threonine, Cystine, Citrulline — as mixture	10 mg of each	Dowex 2	80 ml. of 1 N acetic acid	95 to 98
Lysine, Tryptophane, Arginine — as mixture	10 mg of each	Dowex 50	80 ml. of 4 N HCl	94 to 98

* in OH^- form ** in H^+ form

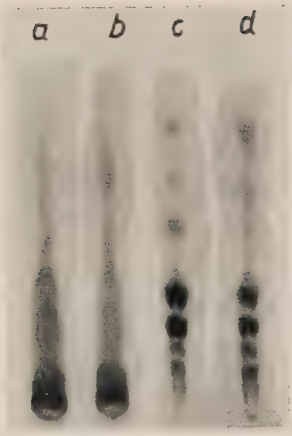
2 column was treated with 2 N NaOH and washed thoroughly with distilled water just before use. Amino acid solutions of known composition were mixed with a standard Richard's medium, 10 ml. of which then were poured on the column and the latter was washed with 80 ml. of water. The washing removed all the nonelectrolytes and cations while amino acids were retained on the column along with other anions. The amino acids were then selectively eluted with 80 ml. of normal acetic acid. The eluate was evaporated under reduced pressure to dryness and the residue dissolved in a convenient volume of water. The recovered amounts of amino acids were determined according to the procedure of Rosen (1957). Colour intensity was compared with the original solution without any addition of nutrients and which had been kept as a control. In the case of mixtures the total ninhydrin colour was compared with the control and in event of loss in the colour the eluate was subjected to paper chromatography to determine the lost fraction.

Dowex 50 was tested for the retention capacity of tryptophane, arginine and lysine as these amino acids were not adsorbed by Dowex 2 (Drèze et al. 1954). In these experiments the column was washed with 0.5 N HCl after the amino acid solution was allowed to pass through. Elution of amino acids was accomplished with 80 ml. of 4 N HCl and the results are given in Table 1. Presumably, all neutral and acidic amino acids were extractable with Dowex 2 and others with Dowex 50, in near 100 percent amounts. For experimental work (Section C) 10 ml. samples of the culture filtrate were passed through the resin columns. The final residue after the evaporation of the acids eluate was taken in 0.5 ml. of 10 % iso-propanol and stored at — 20 °C. Finally 20 to 40 μl. of the extract were placed on each chromatogram.

f) Paper Chromatography and Identification of Amino Acids

One and two dimensional chromatograms were run for the separation of various amino acids present in the extracts previously mentioned. Whatman No. 1 paper was found quite suitable and was used without any previous treatment or washing. The chromatograms were run in the following solvents: a) n-butanol, acetic acid and water (100 : 22 : 50 by vol.), b) phenol and water (100 : 39 W/V, Stepka 1957). For a two dimensional chromatogram the solvents were used in the order mentioned above. Chemicals of chromatographic grade were used and phenol was prepared by distilling its chemically pure grade under reduced pressure and storing it in stoppered bottles in cold. Chromatograms were dried at 45 °C in exhaust. Phenol took a longer time to disappear completely and chromatograms were hung in the room for a few days till the odour of phenol was no longer apparent.

Dried chromatograms were sprayed with 0.25 % ninhydrin solution in 96 % ethanol and spots developed in an oven at 105 °C for 15 minutes. Reference substances were run with the unknown. Further identification of



the various spots was facilitated by the amino acid map given by STEPKA (COLOWICK and KAPLAN 1957). In addition specific chemical tests were made for some of the amino acids e. g. o-phthalaldehyde test for glycine, SAKAGUCHI reaction for arginine, sodium nitroprusside test for cystine and NESSLERS reagent saturated with $NaIO_4$ for serine and threonine (BLOCK, DURRUM and ZWEIG 1955).

Fig. 1. One dimensional chromatogram (run in butanol, acetic acid and water) of the amino acids of the culture filtrate of *Fusarium lycopersici*. a and b: 14 and 20 days old cultures respectively. c and d: Dowex 2 extracts of the same 14 and 20 days old cultures respectively

g) Quantitative Estimation of Amino Acids on Paper Chromatograms

One percent ninhydrin solution in absolute ethanol containing 0.1 % 8-hydroxyquinoline was applied by pipette to the chromatograms. They were then heated for half an hour at 60 °C in a closed oven saturated with alcoholic vapours. The spots of individual amino acids after identification were cut out, weighed and further cut into smaller pieces before putting them in test tubes for elution. Each test tube contained 5 ml. of 50 % ethanol buffered at pH 7 (SÖRENSENS 0.025 M phosphate buffer, COLOWICK and KAPLAN 1957). The tubes were covered with a paraffin layer, shaken vigorously and left for a few hours. The optical density of the eluate was measured at 570 mμ and the amount calculated from the standard curves prepared with known amino acids.

Background corrections were made by eluting comparable amino acid-free areas from the chromatograms. The above method was devised by PORTER, MARGOLIS and SHARP (1957).

4. Radioisotopic Techniques

The radioactivity of samples was measured through an end-thin-window GEIGER-MÜLLER counter. A LANDIS & GYR, ELA 2 64-scaler with a EQB 1 GM-tube having a window diameter of about 25 mm and a thickness of 2 to 3 mg/sq. cm., was used. The samples were always counted at a fixed distance from the window.

In the course of experimental work it was found necessary to determine the specific radioactivity of very small amounts of fusaric acid, usually between 200 and 500 μg, which were separable in pure form only on paper chromatograms (Sections E and F). A workable method was evolved in which the radioactivity of the fusaric acid spot was measured directly and the spot was then eluted for determining the amount of fusaric acid. The procedure adopted was as follows: fusaric acid spots on the paper chromatograms

were marked with a pencil under ultraviolet light and cut out in circular shapes with 2.4 cm diameter; this was slightly less than the diameter of the counting-tube opening. The cut spot was put under the GM-tube so that it was exactly covered by the opening of the tube. After counting the spot was eluted and the amount of fusaric acid determined according to the method described previously. It was found desirable to keep the amount of fusaric acid within a range of 25 to 40 μg per spot.

C. AMINO ACID METABOLISM OF *FUSARIUM LYCOPERSICI* IN RELATION TO FUSARIC ACID PRODUCTION

Sanwal (1956) investigated the relations of α-amino nitrogen and fusaric acid contents of still cultures of *F. lycopersici* over a period of six weeks. He found that the two peaks of fusaric acid correspond to the two depressions in amino nitrogen contents of the culture filtrates. It was suggested that certain amino acids must be responsible for this relationship and these could be the compounds involved in the biosynthesis of fusaric acid. Flück and Richle (1955) paper chromatographically analysed the amino acids of culture filtrate and mycelium under a similar set of conditions. By visual comparison of the intensity and size of the ninhydrin spots, they reported that alanine and citrulline decreased and increased inversely to fusaric acid. Drawing their conclusion from this relationship they held alanine and citrulline as possible precursors of fusaric acid. It was however deemed desirable to test this hypothesis quantitatively. Thus the same strain ETH 5414 of *F. lycopersici* was grown in standing cultures in the dark at 27 °C. Observations were made on mycelial dry weight, pH, fusaric acid production, amino nitrogen and amino acid contents of the culture filtrate and mycelium. The data are given in Table 2 and Figures 2, 3, 4 and 5.

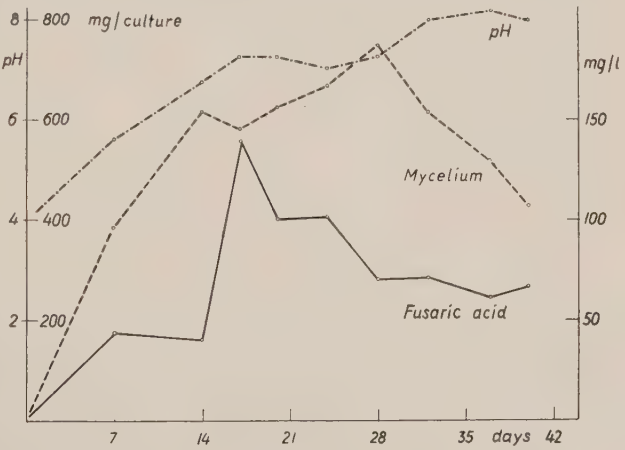


Fig. 2. Dry weight of the mycelium, fusaric acid production and pH of the culture filtrate of *Fusarium lycopersici* grown in standing cultures. Ordinate (right): fusaric acid; ordinate (left): dry weight of the mycelium

The standing cultures of *F. lycopersici* showed a continuous increase in dry weight of the mycelium for 25 days. A gradual decrease afterwards indicated autolysis. During the entire incubation period the hydrogen ion concentration decreased continuously (Fig. 2).

Fusaric acid production started quite early and reached a maximum on the seventeenth day when the mycelium was still growing showing thereby that fusaric acid was a product of active growth and not of autolysis (SANWAL 1956). After seventeen days of incubation the fusaric acid contents of the culture filtrate gradually decreased without showing second maxima as observed by SANWAL (1956). STOLL (1957) has reported yields as high as 280 mg of fusaric acid per litre while the current investigations detected only half as much and it was assumed that the fungus had undergone some physiologic alteration.

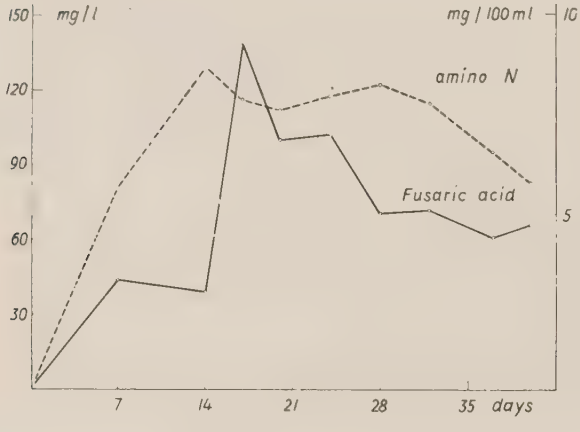


Fig. 3. Fusaric acid and amino nitrogen content of the culture filtrate of *Fusarium lycopersici* grown in standing cultures
Ordinate (right): amino nitrogen; ordinate (left): fusaric acid

During the early period of growth, the amino acid content of the culture filtrate increased attaining a peak on the 14th day when about 8 mg per 100 ml. were detectable. This was followed by a decline which corresponded to the increased production of fusaric acid noted between 14 and 17 days. A slight upward trend was shown between 20 and 28 days after which amino nitrogen content of the culture filtrate again decreased (Fig. 3).

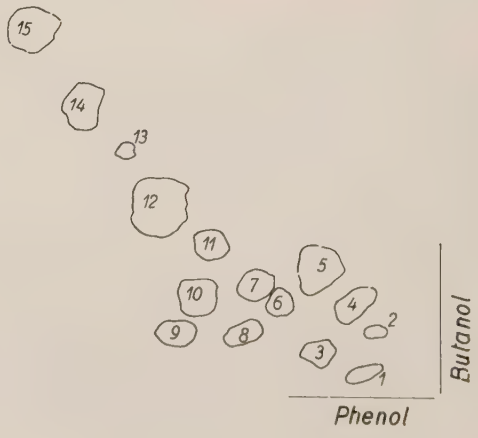


Fig. 4. A map of the two dimensional chromatogram of the free amino acids of the mycelium of *Fusarium lycopersici*. The amino acids have been identified as: 1) cystine, 2) unidentified III, 3) lysine, 4) aspartic acid, 5) glutamic acid, 6) serine, 7) glycine, 8) asparagine, 9) arginine, 10) unidentified IV, 11) threonine, 12) α-alanine, 13) β-alanine, 14) γ-aminobutyric acid, 15) valine and 16) leucine

Two dimensional chromatograms of the alcoholic extracts of mycelium showed sixteen different amino acids. These had been identified as cystine, aspartic acid, lysine, glutamic acid, serine, glycine, asparagine, threonine, arginine, α- and β-alanines, γ-aminobutyric acid, valine and leucine. Two of the amino acids could not be identified and are shown in Fig. 4.

α-Alanine was present in greatest amounts followed by glutamic acid, appearing on the 14th day in concentrations of 130 and 56 μmoles per culture respectively. Aspartic acid, γ-aminobutyric acid and arginine were present in lesser amounts while the remaining amino acids appeared in still lower quantities. In the early stages of growth larger amounts of the various amino acids were found, but these diminished as the incubation period proceeded. α-Alanine and glutamic acid showed pronounced declines because of their comparatively higher initial amounts.

Table 2

Quantitative analysis of the amino acids of the culture filtrate and mycelium of *Fusarium lycopersici* in relation to its fusaric acid production in standing culture

Amino acids	Amino acids of the culture filtrate μ moles per culture				Free amino acids of the mycelium μ moles per culture			
	Age of the culture in days				Age of the culture in days			
	14	17	20	28	14	17	20	28
Unidentified I	3.0*	5.0	3.5	6.5	A**	A	A	A
Unidentified II	5.0	A	5.0	6.0	A	A	A	A
Unidentified III	A	A	A	A	T***	4.0	4.5	7.0
Cystine	4.0	3.0	4.0	3.0	4.5	3.0	2.5	3.0
Aspartic acid	8.5	3.5	6.0	3.5	20.0	14.0	4.0	6.0
Lysine	T	T	T	T	6.0	3.5	2.0	2.0
Serine	2.5	5.5	T	T	10.0	8.0	4 0	4.0
Glutamic acid	48.0	31.5	31.0	12	56.0	28.0	12.5	14.0
Glycine	7.5	7.0	4.0	5.0	4.0	4.0	2.5	2.0
Asparagine	T	T	T	T	15.0	6.0	3.5	T
Threonine	3.0	4.5	1.5	3.5	3.5	2.0	T	T
Unidentified IV	A	A	A	A	14.0	8.0	2.0	T
Arginine	T	T	T	T	11.0	6.0	3.0	2.5
α-Alanine	58.0	39.0	28.0	19.0	130.0	78.0	15.0	13.0
β-Alanine	3.5	T	3.0	1.5	2.5	T	T	T
γ-Aminobutyric acid	10.0	3.5	4.5	1.5	9.0	8.5	5.5	2.0
Valine	11.5	7.5	12.0	13.0	6.0	3.5	3.0	5.0
Leucine	10.5	7.5	14.0	22.5	8.5	5.0	4.0	9.0
Fusaric acid	20.0	74.0	51.0	39.0				

* The amount of unidentified amino acids is expressed in leucine μ moles.

** Absent.

*** Traces.

Almost all of the amino acids that were present in the free state in the mycelium were detectable in the culture filtrate (Fig. 5), the exceptions being the "unidentified" III and IV. Arginine and asparagine were detected in very small amounts. The quantitative proportions of various amino acids agreed with the pattern of free amino acid contents of the mycelium, α-alanine predominating followed by glutamic acid. As in the case of mycelium the amino acids showed their maximum amounts on the 14th day and afterwards a decrease was apparent, although not uniform for all the amino acids. The disappearing amino acids were most likely reutilized for protein synthesis as has been reported for microorganisms in general (FOSTER 1949).

Fig. 5. A map of the two dimensional chromatogram of the amino acids from the culture filtrate of *Fusarium lycopersici*. The amino acids have been identified as: 1) cystine, 2) unidentified I, 3) unidentified II, 4) aspartic acid, 5) lysine, 6) glutamic acid, 7) serine, 8) asparagine, 9) glycine, 10) threonine, 11) α-alanine, 12) β-alanine, 13) γ-aminobutyric acid, 14) valine and 15) leucine

From these studies it was apparent that amino acids, in general, were present in largest amounts during the early growth of the organism and as this growth slowed down, perhaps with the exhaustion of sugar, their quantities diminished. It was of considerable interest in our present investigations to find that fusaric acid production increased with the simultaneous reutilization of amino acids of the mycelium and culture medium. This indicated that the metabolism of absorbed amino acids led to processes that also produced fusaric acid. We have seen that α-alanine and glutamic acid played a greater role because of their quantitative preponderance. There was therefore reason to examine these two amino acids as possible precursors of fusaric acid. One way of testing the precursor value of these amino acids, and also of others, was to see whether or not their addition to the culture medium had any effect on the fusaric acid production of the fungus. In such tests, at least immediate precursors would result in higher yield of fusaric acid. This aspect of the problem is pursued in the following section.

D. STUDIES WITH PRE-GROWN MYCELIUM OF *FUSARIUM LYCOPERSICI* SACC.

Replacement cultures have been widely used in the study of metabolic pathways in both bacteria and fungi. This method involves the use of pre-grown mycelium which, at a suitable stage, is freed of its original culture medium and supplied with fresh one of desired composition. This technique has the advantage of making possible the supression of growth and other assimilatory processes (FOSTER 1949). Using washed mycelium, HALLIDAY and ARNSTEIN (1956) and ARNSTEIN and MARGREITER (1958) studied the effect of various nutrients and precursors on the penicillin production by *Penicillium chrysogenum.* As pointed out in the previous section, it was necessary to examine the influence of various amino acids on the fusaric acid production of *F. lycopersici.* This was accomplished through the use of washed, pre-grown mycelium of the fungus.

E x p e r i m e n t I. The original culture medium of fifteen day-old standing cultures of *F. lycopersici* was gently poured off while the mycelial mats were retained in the Erlenmeyers. The mat in each flask was washed thrice with 100 ml. of sterilized distilled water. One hundred ml. of RICHARDS medium were then added to each flask and incubated. All manipulations were performed aseptically. Determination of pH, dry weight of the mycelium and fusaric acid production was made on specified days after the transfer and incubation. Results are given in Figure 6.

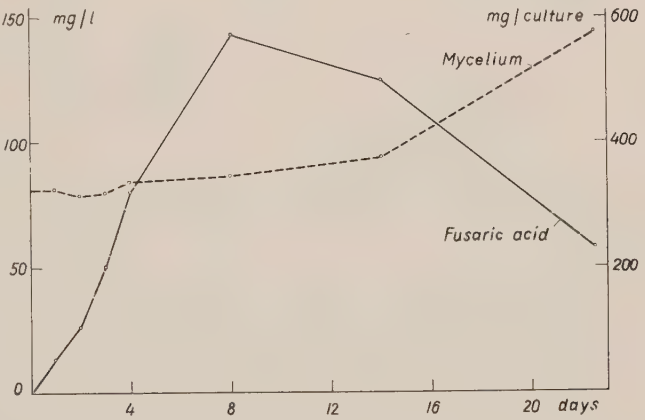


Fig. 6. Fusaric acid production and dry weight of mycelium (mycelial mats) after the replacement of the culture medium of 15 days old standing cultures of *Fusarium lycopersici.* Ordinate (right): dry weight of the mycelium; ordinate (left): fusaric acid

E x p e r i m e n t I I. In this experiment, the conditions were similar to the preceding one, however, additions of various amino acids in 20 mMol amounts were made. Two replicates were used for each amino acid. After three days of incubation pH, dry weight of the mycelium and fusaric acid amount of the culture filtrates were measured (Table 3).

E x p e r i m e n t I I I. The purpose of the experiment was to see the influence of the amino acids on the fusaric acid production by non-fermenting mycelium. Fresh medium was made free of sugar, and amino acids were

Table 3

The effect of various amino acids on the fusaric acid production of fermenting mycelium of *Fusarium lycopersici* Sacc.

Amino acid added*	Final pH** of the Culture Filtrate	Dry weight of Mycelium mg/Culture	Fusaric acid produced in 72 hours mg/Culture
None	5.2	239	3.80
α-Alanine	3.9	221	3.00
β-Alanine	4.8	245	3.90
Arginine	4.0	219	3.00
Aspartic acid	4.5	337	2.88
Casein hydrolysate	3.9	223	3.10
Citrulline	4.0	264	2.80
Glutamic acid	5.2	383	3.60
Glycine	4.5	229	3.60
Histidine	3.7	228	3.68
Isoleucine	4.3	264	2.96
Leucine	4.1	250	2.40
Lysine	4.1	203	2.80
Methionine	3.8	226	3.68
Ornithine	4.7	232	3.50
Phenylalanine	4.2	200	3.78
Proline	4.2	210	3.40
Tryptophane	3.8	225	3.25±0.30***
Valine	3.7	206	4.32

* 2 mMol of the amino acid per replicate.

** Initial pH 4.5.

*** Amount determined from the area of fusaric acid spot after a spray of DRAGENDORFF reagent.

added in a manner similar to experiment II. The results are presented in Table 4.

The data given in Figure 6 and Tables 3 and 4 have been interpreted as follows:

a) The production of fusaric acid begins immediately after the addition of fresh medium, and within 24 hours appreciable amounts of the acid were extractable both from fermenting and non-fermenting cultures (Fig. 6).

b) The fusaric acid curve followed a linear course reaching its optimum on the 8th day after which a gradual downward trend ensued. It was interesting to note that the maximum amount of fusaric acid produced in the cultures with replaced medium was about the same as in the standing cultures, approximately 140 mg per litre (compare Figs. 2 and 6). It is likely that with this amount of fusaric acid in the culture medium a saturation point of the enzyme concerned in its biosynthesis by *F. lycopersici* was reached.

Table 4

The effect of various amino acids on the fusaric acid production of non-fermenting mycelium of *Fusarium lycopersici* Sacc.

Amino acid added*	Final pH** of the Culture Filtrate	Dry weight of Mycelium mg/Culture	Fusaric acid produced in 24 hours mg/Culture
None	5.9	223	1.00
α-Alanine	5.5	188	0.90
β-Alanine	5.6	213	1.05
Arginine	4.8	168	0.66
Aspartic acid	4.6	247	0.95
Casein hydrolysate	4.7	209	0.75
Citrulline	5.7	226	1.10
Glutamic acid	5.1	275	0.97
Glycine	5.9	228	1.18
Histidine	4.7	172	0.95
Isoleucine	5.1	197	1.08
Leucine	5.4	187	1.12
Lysine	5.8	201	0.82
Methionine	4.3	182	0.95
Ornithine	5.7	272	1.10
Phenylalanine	4.9	198	1.27
Proline	5.7	190	0.90
Tryptophane	5.5	182	0.85 ± 0.10***
Valine	5.6	202	0.96

* 2 mMol of the amino acid per replicate.
** Initial pH 4.5.
*** Amount determined from the area of fusaric acid spot after a spray of DRAGENDORFF reagent.

c) The growth of the fungus in replacement cultures was at first slow and it was only after 14 days of incubation that the dry weight of the mycelium showed a steady increase.

d) Fusaric acid was also produced in non-fermenting cultures; however, in the absence of exogenous carbohydrate supply the fungus was obliged to metabolize its internal reserves.

e) In most instances the addition of amino acids including casein hydrolysate did not show any marked stimulation in fusaric acid production. In non-fermenting cultures there were some amino acids which showed slightly higher yields than the control. In the case of phenylalanine and glycine, increases of 27 and 18 percent respectively were registered while citrulline, leucine and ornithine showed about 10 percent higher yield of fusaric acid. All these amino acids failed to show a stimulatory effect in fermenting cultures. Valine, on the other hand, enhanced the yield by about 10 percent in the presence of glucose but not in its absence. The comparison of the results, however was made difficult as the replacement culture technique utili-

zed mycelial mats which had the following inherent drawbacks: first, the mats did not possess uniform amount of mycelium as shown by their dry weights, and second, it was difficult to wash them uniformly as certain metabolites from the pre-harvest stage continued to adhere to the compact mycelial mats.

Since the above difficulties arise from growing the fungus in standing cultures it would seem that shake culturing could eliminate them. Unfortunately *F. lycopersici* did not produce appreciable amounts of fusaric acid in shake cultures. *Gibberella fujikuroi* on the other hand offered much better possibilities in this respect and hence was utilized.

E. STUDIES WITH PRE-GROWN MYCELIUM OF *GIBBERELLA FUJIKUROI* (SAW.) WOLL.

As pointed out in the preceding section, there was a need for a fungus that would produce not only uniform mycelium but also a sufficiently high amount of fusaric acid in shake cultures. STOLL (1954) reported the synthesis of fusaric acid in appreciable quantities by *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. in shake cultures. He used the *Ustilago* spore germination test for estimating the fusaric acid contents of the culture filtrates (KERN 1952). The same strain ETH M 82 of *G. fujikuroi* as used by STOLL (1954) was grown in shake cultures (procedure described in Methods) and its dry weight and fusaric acid production was studied (Fig. 7).

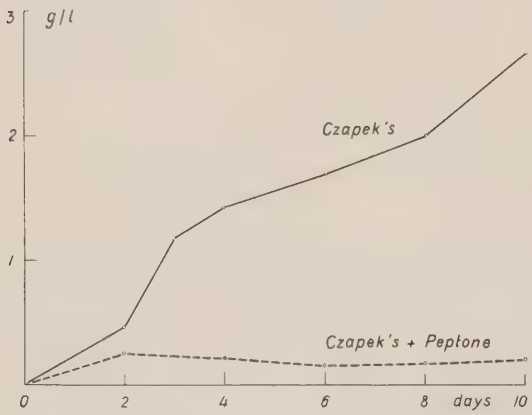


Fig. 7. Production of fusaric acid in the shake cultures of *Gibberella fujikuroi* in CZAPEK's medium (full line) and in CZAPEK's medium with 5 % peptone (dotted line)

G. fujikuroi produced comparatively very high amounts of fusaric acid. The curve followed an upward course till the 10th day of growth at which time the experiment was terminated. The steepest region of the curve laid between 3rd and 5th days of incubation and a maximum yield of fusaric acid of 2.65 gm per litre, which was about 20 times that of *F. lycopersici*, was obtained on the 10th day. When mycelium from the shake cultures of *G. fujikuroi* was harvested, washed and resuspended in fresh medium, considerable production of fusaric acid was obtained within a few hours of incubation on the shaker. An addition of 5 % peptone to culture medium resulted in more mycelial growth but very low fusaric acid yield. The uniform nature of the mycelium (without forming clumps) along with better yield of

fusaric acid in pure CZAPEKS medium made this fungus highly suitable for further work on the biosynthesis of fusaric acid.

Using pre-grown mycelium of *G. fujikuroi*, the influence of various amino acids on the production of fusaric acid was studied once again. The procedure adopted was as follows: mycelium from 3 days-old shake cultures of *G.fujikuroi* was harvested by filtering on a Buchner funnel and washed with distilled water. It was then suspended for one hour in saline water (0.9 % NaCl), filtered and rewashed with distilled water. This procedure helped remove the adhering metabolites of the pre-harvest stage. A uniform suspension in CZAPEKS medium was prepared from the washed mycelium by stirring with a blender. The mycelium from 4 original cultures made 100 ml. of final

Table 5

The effect of various amino acids on the synthesis of fusaric acid by the pregrown mycelium of *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll.

Amino acid added*	Without Glucose		With Glucose	
	Dry Weight of Mycelium mg/Culture	Fusaric acid produced in 5 hours mg/Culture	Dry Weight of Mycelium mg/Culture	Fusaric acid produced in 5 hours mg/Culture
Experiment I				
None	302	1.58	343	5.12
α-Alanine	314	1.60	342	4.24
β-Alanine	310	1.68	347	5.84
γ-Aminobutyric acid	312	2.03	357	6.24
Isoleucine	301	1.14	337	2.56
Ornithine	317	1.33	346	5.04
Proline	313	1.80	348	3.84
Serine	317	1.98	330	4.40
Threonine	302	1.21	336	3.52
Yeast extract	302	2.40	340	3.45
Experiment II				
None	670	3.10	785	10.40
Arginine	743	2.94	848	8.60
Aspartic acid	697	2.64	777	8.40
Casein hydrolysate	758	3.44	804	8.20
Glutamic acid	709	3.60	760	9.80
Glycine	696	2.70	770	9.50
Leucine	717	2.19	788	8.25
Lysine	683	4.05	761	11.90
Methionine	700	1.92	736	8.10
Phenylalanine	689	3.18	779	9.60
Tryptophane	680	2.70 ± 0.3	785	8.20 ± 0.80**
Valine	706	2.46	815	9.75

* 2 mMol of the amino acid per replicate.

** Amount determined from the area of fusaric acid spot after a spray with DRAGENDORFF reagent.

suspension from which 50 ml. were poured into 500 ml. capacity Erlenmeyer flasks containing 50 ml. of fresh medium. Then to each flask 2 mMol of one of the various amino acids were added. In order to study the effect of amino acids in non-fermenting cultures, sugar was withheld from half of the series. The flasks were then incubated for 5 hours on a shake machine after which dry weight of the mycelium and fusaric acid contents of the filtrates were determined. All manipulations were made under aseptic conditions.

From the data given in Table 5 it was clear that resuspended mycelium of *G. fujikuroi* synthesized appreciable amounts of fusaric acid in as short a time as 5 hours. It produced over three times more fusaric acid when glucose was supplied than in its absence and not a single amino acid could bring the yield of non-fermenting mycelium equal to that of fermenting one. This showed that the higher metabolic rate in the presence of exogenous glucose supply was responsible for higher producion of fusaric acid.

In non-fermenting cultures the stimulatory effect of some amino acids on the fusaric acid production was evident. γ-Aminobutyric acid and lysine showed a yield which was higher than that of the control by about 30 percent. Similarly, a 12 to 20 percent increase was shown by β-alanine, proline, serine, glutamic acid and casein hydrolysate. The higher yields may either be interpreted as due to the amino acids acting as carbon sources for the general metabolism of the fungus in the absence of glucose or due to their direct participation in the biosynthesis of fusaric acid.

Only three amino acids, γ-aminobutyric acid, lysine and β-alanine, appeared to stimulate the synthesis of fusaric acid by fermenting mycelium. With γ-aminobutyric acid the yield was 25 % higher and the other two amino acids gave about 15 % increase. It can be considered likely that these amino acids acted as precursors of fusaric acid but the possibility of their playing a simple stimulatory role in the processes concerned with the biosynthesis of fusaric acid should not be ruled out. It is interesting to note that all the three amino acids have an amino group in other than the alpha position; lysine also possesses an alpha amino group.

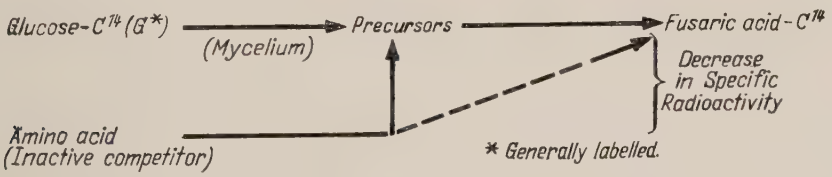
It was thought that isotopic techniques might be useful in studying the basis of the stimulatory role of various amino acids in the synthesis of fusaric acid. The origin of fusaric acid carbon, for example, could be worked out by employing C^{14}-labelled precursors. The following section deals with the studies made in this direction.

F. ISOTOPIC COMPETITION IN FUSARIC ACID BIOSYNTHESIS

We have seen that pre-grown mycelium of *G. fujikuroi* produced at least three times more fusaric acid when glucose was present in the medium. It would therefore be natural to expect the synthesis of radioactive fusaric acid in the presence of C^{14}-labelled glucose. That this was really so was

found out through the following experiment: pre-grown mycelium (having about 50 mg of dry weight) was suspended in 12 ml. of fresh CZAPEKS medium containing 20 mg of generally labelled glucose-C^{14} with a total activity of 2 microcuries. After three hours of incubation on the shake machine fusaric acid was extracted and chromatographically isolated. The radioactivity of the fusaric acid spot, marked under ultraviolet lamp on the paper chromatogram, was measured with the GEIGER-MÜLLER counter. It was found that synthesized fusaric acid was about half as active as the supplied glucose, and moreover it was the only active substance obtained in the ethyl-acetate extracts of culture filtrate (extraction done at pH 4). The success of this experiment brightened the chances of using C^{14}-labelled substances for elucidating the biosynthetic pathways concerned in the production of fusaric acid.

The aim of the studies given in this section was to determine which of the commonly occurring amino acids contribute their carbon to the fusaric acid molecule. Included also was the question raised previously: whether or not the amino acids which have been reported earlier to stimulate fusaric acid production of pre-grown mycelium actually take part in its biosynthesis by contributing the whole or a part of their molecule. The answer to these questions were sought through isotopic competition technique of ROBERTS, ABELSON, COWIE, BOLTON and BRITTEN (1955) which involved the feeding of inactive amino acids, single or in mixtures, along with active glucose to the fungus. With this technique a resulting decrease in the specific radioactivity of fusaric acid would be taken as a measure of the contribution of carbon from the respective metabolite to fusaric acid during its biosynthesis by *G. fujikuroi*. The following scheme represents the concept of isotopic competition in the biosynthesis of fusaric acid:



Pre-grown mycelium of *G. fujikuroi* was obtained as described in Section E. After proper washing it was suspended in sugar-free CZAPEKS medium. One hundred ml. of a homogeneous suspension was prepared from the mycelium obtained from 5 original cultures. Five ml. of this suspension were poured into 500 ml. Erlenmeyer flasks which contained 7 ml. of CZAPEKS medium which had 20 mg of active glucose, with a total radioactivity equal to 2 micro curie, and an amino acid competitor. The amount of amino acid and glucose carbon was adjusted to a ratio of 1 : 1. The flasks were incubated for three hours on the shake machine after which fusaric acid was extracted and from each aliquot 0.5 ml. extract in 80 % ethanol was prepared for chromatography. The chromatograms were run in secondary

butanol, formic acid and water. However when fumaric acid was the competitor it overlapped fusaric acid in butanol solvent and thus separation of the two acids was obtained in CCl_4, acetic acid and water solvent (80 ml. of CCl_4 were shaken with 5 ml. of acetic acid and 15 ml. of water). The results obtained from various amino acids and other metabolites are given in Tables 6 and 7.

Table 6

Reduction in the specific radioactivity of fusaric acid synthesized by *Gibberella fujikuroi* fermenting on glucose-C^{14} (G) through the isotopic competition of added inactive amino acids

Competitor	Amount of Fusaric acid per Spot μg	Total Radioactivity of the Spot cpm	Specific Radioactivity of Fusaric acid cpm/μ atom C	Reduction in Specific Radioactivity of Fusaric acid percent
Experiment I				
None	31.5	285	162	—
Acetate	30.0	221	132	19
α-Alanine	33.5	238	127	22
β-Alanine	35.0	272	139	14
Aspartic acid	32.5	252	139	14
Glutamic acid	28.0	230	147	9
Glycine	29.0	241	149	8
Experiment II				
None	26.0	195	134	—
γ-Aminobutyric acid	31.5	174	99	26
Histidine	27.0	188	125	7
Leucine	28.0	199	127	5
Lysine	30.5	200	118	12
Serine	28.0	167	107	20
Succinate	25.0	160	115	14

On the basis of their capacity to reduce the specific radioactivity of fusaric acid, the various amino acids could be divided into three main groups. γ-Aminobutyric acid, α-alanine, serine and acetate belonged to the first group and brought a 20 to 30 percent reduction. In the second group, a 15 percent dilution in the radioactivity of the synthesized fusaric acid was effected by aspartic acid, β-alanine and TCA cycle intermediates like fumarate and succinate. The remaining amino acids, which were put in the third group, did not take any significant part in the isotopic competition and were, apparently, not metabolites of importance in the biosynthesis of fusaric acid.

In viewing the precursor function of the various competitors from their role in lowering the specific radioactivity of fusaric acid, compounds of the first group acquired special significance. γ-Aminobutyric acid, which contributed maximum to fusaric acid carbon, seems a probable precursor, and that it also stimulated fusaric acid production supports this conclusion fur-

ther. α-Alanine, serine and acetate, singly and collectively, showed an additive effect to that of γ-aminobutyric acid in further lowering the activity of fusaric acid. This fact makes them likely precursors although, from the data in hand, the exact manner of their participation in the biosynthesis of fusaric acid is difficult to trace. Aspartic acid and β-alanine on the other hand did not show any additive effect when present as competitors along with γ-aminobutyric acid, therefore, their role in the biosynthesis of fusaric acid appears to be of general nature like that of succinate and fumarate.

Table 7

Reduction in the specific radioactivity of fusaric acid synthesized by *Gibberella fujikuroi* fermenting on glucose-C^{14} (G) through the isotopic competition of added inactive amino acids

Competitor	Amount of Fusaric acid per Spot μg	Total Radioactivity of the Spot cpm	Specific Radioactivity of Fusaric acid cpm/μ atom C	Reduction in Specific Radioactivity of Fusaric acid percent
Experiment III				
None	32.0	270	154	—
Citrulline	29.0	236	146	5
Formate	25.0	188	135	12
Fumarate	32.5	236	130	16
Phenylalanine	31.0	251	145	6
Pyruvate	34.0	243	128	17
Trytophane	30.0*	252	151	2
Experiment IV				
None	36.5	222	109	—
γ-Aminobutyric acid	33.0	142	77	29
γ-ABA** + Acetate	39.0	159	73	33
γ-ABA + α-Alanine	40.0	159	71	35
γ-ABA + β-Alanine	38.5	178	83	24
γ-ABA + Aspartic acid	34.0	156	82	25
γ-ABA + Serine ..	37.0	152	74	32
γ-ABA + Acetate + α-Alanine + Serine	38.0	138	65	40

* Amount determined from the area of the fusaric acid spot after a spray with Dragendorff reagent.

** γ-ABA stands for γ-aminobutyric acid.

The isotopic competition experiments have further revealed the fact that tryptophane is not involved in the biogenesis of fusaric acid although in *Neurospora* this amino acid is intimately concerned in the biosynthesis of nicotinic acid (Meister 1957).

G. CONTRIBUTION OF SOME C^{14}-LABELLED PRECURSORS TO FUSARIC ACID CARBON

The isotopic competition experiments have shown that some of the amino acids did participate in the biosynthesis of fusaric acid. A major role is attributable to γ-aminobutyric acid, α-alanine, serine and acetate which contributed to about 25 percent of the fusaric acid carbon when competing with active glucose. In the present section these substances were supplied to the fungus in labelled form in order to study the conversion of their radioactivity into that of fusaric acid. This conversion was taken as an index of their role in fusaric acid biosynthesis.

In these experiments the glucose supplied was inactive and the precursors added were active; the rest of the procedure was similar to that adopted in the preceding section. The total radioactivity for each replicate was 2 μc and the control contained only active glucose. After incubating the mycelium for three hours on a shake machine synthesized fusaric acid was isolated and its specific radioactivity measured. The results are given in Table 8.

Table 8

Incorporation of the radioactivity of some labelled metabolites into fusaric acid. The labelled precursors were added to the pregrown mycelium of *Gibberella fujikuroi* fermenting on inactive glucose

Precursor*	Specific Radioactivity of Precursor cpm/μ atom C	Specific Radioactivity of Fusaric acid cpm/μ atom C	Conversion of Precursor Radioactivity to Fusaric acid Radioactivity percent
Glucose-C^{14} (G**)	228	92	40
Glycine-2-C^{14}	198	17	9
γ-Aminobutyric acid-1-C^{14}	213	24	12
Acetate-1-C^{14}	204	42	21
α-Alanine-C^{14} (G)	222	62	28
Serine-C^{14} (G)	220	59	27
α-Alanine-C^{14} (G) + Serine-C^{14} (G)	224	63	28
Fumarate-2,3-C^{14}	158	0	0

* Total radioactivity per replicate 2 μc.
** Generally labelled.

It is apparent from the conversion of the glucose radioactivity to that of fusaric acid that 40 percent of the synthesized acid came from exogenous glucose and the rest from endogenous metabolites of the fungus. The only TCA cycle intermediate tested, fumarate-2, 3-C^{14}, failed to contribute its active carbon to fusaric acid; the possibility however of its carboxylic carbon playing some role remains to be explored. A comparatively low percentage of fusaric acid carbon originated from glycine-2-C^{14} and γ-aminobutyric

acid-1-C^{14}, that is 9 and 12 percent respectively. It is thus suggested that, so far as the active carbon atoms are concerned, these amino acids play a minor role in the biosynthesis of fusaric acid. The results of the isotopic competition however point to the significant contribution of γ-aminobutyric acid to fusaric acid carbon which must be due to its carbon other than the alpha one.

α-Alanine-C^{14} (G) and serine-C^{14} (G) were readily incorporated into fusaric acid, even in the face of competition from exogenous inactive glucose and endogenously produced metabolites. These amino acids accounted for about 28 percent of the synthesized fusaric acid and thus they qualify as probable precursors of fusaric acid. Acetate-1-C^{14} was also utilized for the synthesis of fusaric acid and the value of the conversion of its radioactivity was 21 percent which is suggestive of a precursor role for acetate.

Although α-alanine, serine, γ-aminobutyric acid and acetate do play the role of precursors the exact manner of their participation in the biosynthesis of fusaric acid is unknown. Perhaps further studies in the distribution of radioactive carbon of specifically tagged precursors in the fusaric acid molecule will shed light on this question.

H. DISCUSSION

In the standing cultures of *Fusarium lycopersici* there were stages of growth when previously synthesized amino acids, present in free form within the fungal cells or secreted out into the medium, were reutilized in metabolism. Simultaneously, fusaric acid production was increased which suggested that fusaric acid production might be related to amino acid metabolism. α-Alanine and glutamic acid played a leading role during this stage because of their presence in quantitative preponderance over the rest of the amino acids. *Gibberella fujikuroi,* however, yielded many times less fusaric acid when an amino acid-rich source like peptone was added to culture medium. Since mycelial growth was more rapid it is suggested that precursors of fusaric acid were diverted into protein synthesis. This synthesis would proceed at a higher rate in the presence of balanced amino acid supply.

An outstanding feature of the fusaric acid metabolism of the two pathogens studied is the fact that fusaric acid was a product of active metabolism, probably intimately connected with tricarboxylic acid cycle. Fermenting mycelium, particularly of *G. fujikuroi,* produced three times as much fusaric acid as it did in the absence of glucose. The conversion of glucose radioactivity into fusaric acid was between 40 to 60 percent during the short term experiments. Various amino acids failed to replace glucose in improving the fusaric acid production of the pre-grown mycelia. This fact supports our conclusion that an overall higher rate of metabolism, as is achieved when glucose is supplied, favours optimum fusaric acid production. A more significant stimulation in fusaric acid yield was obtained through the exogenous

supply of γ-aminobutyric acid, lysine and β-alanine. In isotopic competition experiments the latter two did not contribute carbon to fusaric acid. Thus, their role may be either of nitrogen donors or of simple stimulators in the biogenesis of fusaric acid. γ-Aminobutyric acid, however, contributed its carbon as shown by reduction in the radioactivity of fusaric acid when it was added as inactive competitor to the cells fermenting on active glucose.

It has been shown that α-alanine, serine and acetate contribute carbon to fusaric acid. α-Alanine and serine are particularly efficient donors of carbon, conversion of their specific activity was about 28 percent when supplied in labelled form to the mycelium fermenting on inactive glucose. Thus, the consideration of α-alanine and serine as near precursors of fusaric acid is strongly suggested by these results. Acetate-1-C^{14} showed about two third as much conversion of its activity into fusaric acid as the other two amino acids. It might be concluded that acetate contributed carbon to only a specific part of the fusaric acid molecule. γ-Aminobutyric acid-1-C^{14} was found to be less than half as efficient as α-alanine or serine in its incorporation into fusaric acid. However, in isotopic competition it exceeds all the other amino acids in lowering the radioactivity of fusaric acid. It is likely therefore that its carbon other than the carboxylic atom plays the real role in the biosynthesis of fusaric acid.

Fusaric acid, being a pyridine derivative with a 10 carbon skeleton, possesses a relatively elaborate molecular structure. It is, therefore, difficult to speculate how exactly simple metabolites like α-alanine, serine, γ-aminobutyric acid and acetate take part in its biosynthesis. Similarly, in higher plants smaller units originating from substances like alanine and glycine are thought to give rise to the pyridine ring (GRIMSHAW and MARION 1958) but no concrete scheme has so far been put forward which could describe this biosynthetic process. MARTIN and FOSTER (1958) after doing isotopic studies on *Bacillus megaterium*, have conceived a process of direct ring closure between pyruvate and aspartate or between alanine and oxalacetate. The resulting intermediate is then thought to lose two atoms of hydrogen to give rise to dipicolinic acid. It is indicated by the present studies that some such simple mechanism works for the biosynthesis of fusaric acid. The viewpoint that pyridine ring is evolved through more than one pathway in various biological systems (YANOFSKY 1955, GRIMSHAW and MARION 1958, MARTIN and FOSTER 1958), finds further support in the present investigations.

Summary

1. A study has been made of the amino acid metabolism of *F. lycopersici* in relation to its fusaric acid production in standing cultures. The amino acids of the mycelium and culture filtrate were measured by paper chromatography. Extraction of the amino acids from the culture filtrate was made by means of Dowex 2 and Dowex 50 ion exchange resins.

2. Previously synthesized amino acids were observed to be reutilized by the fungus between 14 and 17 days of incubation. Simultaneously the production of fusaric acid was increased. α-Alanine and glutamic acid played a prominent role during this phase primarily because of their presence in quantitative preponderance over the other amino acids.

3. The influence of various amino acids on the production of fusaric acid has been investigated by means of washed mycelial mats of *F. lycopersici* and also by the washed cells of *Gibberella fujikuroi*, grown in shake cultures. In these experiments *G. fujikuroi* gave better results because it synthesized appreciable amounts of fusaric acid in shake culture while *F. lycopersici* failed to do so.

4. The washed cells produced three times more fusaric acid in the presence of glucose than they did in its absence. Out of the many amino acids added to the fermenting cells, only β-alanine, γ-aminobutyric acid and lysine succeeded in further increasing the production of fusaric acid.

5. Feeding of glucose-C^{14}, generally labelled, to the washed cells resulted in the synthesis of radioactive fusaric acid with about 50 percent specific radioactivity of the supplied glucose. Inactive compounds, various amino acids and other metabolites, were added to the culture medium along with labelled glucose (isotopic competition). As a result a significant dilution was obtained in the radioactivity of the synthesized fusaric acid with some of these metabolites for example γ-aminobutyric acid, α-alanine, serine and acetate.

6. The radioactivity of α-alanine-C^{14} (G) and serine-C^{14} (G) was readily incorporated into fusaric acid. To a lesser extent acetate-1-C^{14} was utilized in the biosynthesis of fusaric acid while the participation of glycine-2-C^{14} and γ-aminobutyric acid-1-C^{14} was only slight. The radioactivity of fumaric acid-2,3-C^{14} did not appear in the synthesized fusaric acid.

7. It has been concluded that α-alanine, serine, γ-aminobutyric acid and acetate acted as the precursors of fusaric acid though the exact manner of their participation in the biosynthesis of fusaric acid is still unknown.

Zusammenfassung

1. Die Zusammenhänge zwischen der Fusarinsäurebildung und dem Aminosäurenstoffwechsel wurden in Standkulturen von *Fusarium lycopersici* untersucht. Die Aminosäuren aus dem Mycel und aus dem Kulturfiltrat wurden papierchromatographisch verglichen. Vor dem Chromatographieren wurden die Aminosäuren des Kulturfiltrats an Ionenaustauschern getrennt.

2. Vom Pilz synthetisierte Aminosäuren (vor allem α-Alanin und Glutaminsäure) wurden nach 14 bis 17 Tagen Inkubationszeit wieder in den

Stoffwechsel einbezogen; zu dieser Zeit stieg auch die Fusarinsäureproduktion an.

3. Der Einfluß verschiedener Aminosäuren auf die Fusarinsäurebildung wurde an Hand von Untersuchungen an gewaschenen Myzeldecken von *F. lycopersici* und gewaschenen Zellen von *Gibberella fujikuroi* in Schüttelkultur verfolgt. Im Gegensatz zu *F. lycopersici* bildete *G. fujikuroi* auch in Schüttelkulturen bedeutende Mengen Fusarinsäure.

4. Bei Versuchen über wenige Stunden vermochte Glukose die Fusarinsäurebildung von gewaschenem Myzel um mehr als das Dreifache zu steigern. Von vielen geprüften Aminosäuren führten nur β-Alanin, γ-Aminobuttersäure und Lysin eine weitere Steigerung herbei.

5. Bei Verfütterung von Glukose-C^{14} wurde Fusarinsäure von der halben spezifischen Aktivität der eingesetzten Glukose gebildet. Wurden auch inaktive Komponenten (z. B. Aminosäuren) zusammen mit markierter Glukose in die Kulturlösung gegeben (Methode der Isotopenkonkurrenz), so fand eine merkliche Verringerung der Radioaktivität der Fusarinsäure durch Zugabe folgender Metaboliten statt: γ-Aminobuttersäure, α-Alanin, Serin und Acetat.

6. Die Radioaktivität von α-Alanin-C^{14}, Serin-C^{14} und zu einem kleineren Teil auch von Acetat-1-C^{14}, wurde in die Fusarinsäure eingebaut. Glykokoll-2-C^{14} und γ-Aminobuttersäure-1-C^{14} lieferten nur sehr wenig und Fumarsäure-2.3-C^{14} überhaupt keinen radioaktiven Kohlenstoff zur Bildung der Fusarinsäure.

7. Aus den Versuchen darf geschlossen werden, daß γ-Aminobuttersäure, α-Alanin, Serin und Acetat an der Biosynthese der Fusarinsäure beteiligt sind. In welcher Weise der Aufbau des Toxins erfolgt, läßt sich jedoch heute noch nicht entscheiden.

Sincere thanks are expressed to Professor Dr. E. GÄUMANN, Director of the Department of Special Botany of the Swiss Federal Institute of Technology, for his consistent encouragement and advice in the execution of this work. The writer is grateful to Dr. H. KERN for his interest and numerous suggestions. The help of Dr. ROBERT N. GOODMAN in the preparation of the manuscript is acknowledged. The writer is also grateful to all his colleagues in the laboratory for their help. Some of the preliminary work, particularly in the methodological part, has been based on unpublished studies by Miss M. PAVONI.

The writer is indebted to the authorities of the Swiss Coordination Commission for Technical Help for the grant of a fellowship during the period from March, 1957 to August, 1959. The studies with radioactive isotopes were made possible by a generous grant of the „Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz".

Literature Cited

Abelson, P. H., and H. J. Vogel, 1955: Amino acid biosynthesis in *Torulopsis utilis* and *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. **213**, 355—364.

Arnold, A., C. B. Schreffler and S. T. Lipsius, 1941: Chemical determination of nicotinic acid. Ind. Eng. Chem. (Analyt. Ed.) **13**, 62—63.

Arnstein, H. R. V., and H. Margreiter, 1958: The biosynthesis of penicillin. 7. Further experiments on the utilization of L- and D-valine and the effect of cystine and valine analogues on penicillin synthesis. Biochem. J. **68**, 339—348.

Block, R. J., E. L. Durrum and G. Zweig, 1955: A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press Inc., New York.

Colowick, S. P., and N. O. Kaplan, 1955: Methods in Enzymology **1**, 143. Academic Press Inc., New York.

Drèze, A., S. Moore and E. J. Bigwood, 1954: On the desalting of solutions of amino acids by ion exchange. Anal. Chim. Acta **11**, 554—558.

Foster, J. W., 1949: Chemical activities of fungi. Academic Press Inc., New York.

— —, 1956: Morphogenesis in bacteria: some aspects of spore formation. Quart. Rev. Biol. **31**, 102—118.

Fuerst, R., and R. P. Wagner, 1957: An analysis of free intracellular amino acids of certain strains of *Neurospora*. Arch. Biochem. Biophys. **70**, 311—326.

Gäumann, E., 1957: Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology **47**, 342—357.

— —, 1958: The mechanisms of fusaric acid injury. Phytopathology **48**, 670—686.

— —, St. Naef-Roth und H. Kobel, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.

Grimshaw, J., and L. Marion, 1958: The pyridine ring and the problem of its biosynthesis. Nature **181**, 112.

Halliday, W. J., and H. R. V. Arnstein, 1956: The biosynthesis of penicillin. 4. The synthesis of benzylpenicillin by washed mycelium of *Penicillium chrysogenum*. Biochem. J. **64**, 380—384.

Hardegger, E., und E. Nikles, 1956: Fusarinsäure-(carboxyl-C^{14}) und quaternäre Derivate der Fusarinsäure. Helv. Chim. Acta **39**, 223—229.

Kalyanasundaram, R., und R. Braun, 1958: Über die Probleme der Baumwollwelke. Phytopath. Z. **33**, 321—340.

— —, and L. Saraswathi-Devi, 1955: Zinc in the metabolism of *Fusarium vasinfectum* Atk. Nature **175**, 945.

— —, and C. S. Venkata Ram, 1956: Production and systemic translocation of fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants. J. Indian bot. soc. **35**, 7—10.

Kern, H., 1952: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen das *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **19**, 351—382.

— —, und D. Kluepfel, 1956: Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in vivo. Experientia **12**, 181—182.

Kluepfel, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **29**, 349—379.

Lederer, E., and M. Lederer, 1957: In Chromatography: a review of principles and applications. pp. 300—301. Elsevier Publ. Co., London.

Martin, H. H., and J. W. Foster, 1958: Biosynthesis of dipicolinic acid in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriology **76**, 167—178.

Meister, A., 1957: In Biochemistry of the amino acids, pp. 334—339. Academic Press Inc., New York.

Nakashima, T., 1955: Studies on fusaric acid and analogous compounds. I. Synthesis of 3-sec-butylpyridine. J. pharm. soc. Japan **75**, 1010—1011.

Paech, K., and M. V. Tracey, 1955: Modern methods in plant analysis **2**, 41—42. Academic Press Inc., New York.

Plattner, P. A., W. Keller und A. Bolier, 1954: Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. Helv. Chim. Acta **37**, 1379—1392.

Pope, C. G., and M. F. Stevens, 1939: The determination of amino nitrogen using copper method. Biochem. J. **33**, 1070—1077.

Porter, C. A., D. Margolis and P. Sharp, 1957: Quantitative determination of amino acids by paper chromatography. Contr. Boyce Thompson Inst. **18**, 465—476.

Roberts, R. B., P. H. Abelson, D. B. Cowie, E. T. Bolton and R. J. Britten, 1955: Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Institute of Washington Publ. 607, Washington.

Rosen, H., 1957: A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem. Biophys. **67**, 10—15.

Sanwal, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. Phytopath. Z. **25**, 333—384.

Stepka, W., 1957: Paper chromatography of amino acids. Methods in Enzymology **3**, 504—528. Edited by Colowick and Kaplan. Academic Press Inc., New York.

Stoll, Chr., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanaëkrankheit. Phytopath. Z. **22**, 233—274.

— —, und J. Renz, 1957: Über den Fusarinsäure- und Dehydrofusarinsäurestoffwechsel von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. Phytopath. Z. **29**, 380—387.

— —, — — und E. Gäumann, 1957: Über die Bildung verschiedener Fusarinsäuren durch das *Fusarium lycopersici* Sacc. in saprophytischer Kultur. Phytopath. Z. **29**, 388—394.

Yabuta, T., K. Kambe and T. Hayashi, 1934: Biochemistry of the bakanaë-fungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanaë-fungus. J. agr. chem. soc. Japan **10**, 1059—1068 (Chem. Abstr. **29**, 1132, 1937).

Yanofsky, C., 1955: Tryptophane and niacin synthesis in various organisms. Amino acid Metabolism, pp. 930—944. Edited by McElroy and Glass. John Hopkins Press, Baltimore.

Zähner, H., 1954: Die Bestimmung der Fusarinsäure mit Hilfe der Papierchromatographie. Phytopath. Z. **22**, 227—228.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Forstpflanzenkrankheiten, Hann. Münden

Zur Frage der Infektion beim Lärchenkrebs[1])

Von

H. Zycha

Mit 7 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — 1. Ort der Infektion. — 2. Zeit der Infektion. — 3. Ausbreitung des Pilzes in der Rinde. — 4. Bemerkung zur Frage der Pilzrasse. — 5. Der Ablauf der Krebserkrankung in neuer Sicht. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

Die Anbauwürdigkeit der Lärche (*Larix decidua* Mill.) hängt in hohem Maße davon ab, ob Schäden durch jene Krankheit zu erwarten sind, welche als Lärchenkrebs bezeichnet und als deren Erreger *Dasyscypha Willkommii* (Hart.) Rehm angesehen wird. Solange man die Lärche künstlich in größerem Maßstab anbaut, bewegt daher das Krebsproblem den Forstmann. Obwohl die Krankheit schon vor 100 Jahren erstmalig beschrieben wurde und sich seither viele Veröffentlichungen mit ihr befaßt haben (Aufzählung bei Hopp 1956), hat sich immer noch kein klares Bild ergeben, unter welchen Bedingungen sie auftritt und wie sie zu bekämpfen ist. Dies mag daran liegen, daß die Frage der Infektionsart und des Krankheitsablaufes nicht genügend erforscht ist. Vor allem auf Grund der Arbeiten von Hiley (1919), von Gaisberg (1928), Plassmann (1927) und Langner (1936) glaubte man allerdings, daß diese Dinge geklärt seien. Neuerdings haben aber Hopp (1957) und Day (1958) gezeigt, daß unsere bisherigen Anschauungen offenbar revidiert werden müssen. So konnte Hopp (1957) zeigen, daß die von Hiley (1919) und

1) Die grundlegenden Ideen dieser Arbeit wurden bereits im November 1957 auf der Hochschulwoche in Hann. Münden in einem Vortrag dargelegt.

Ein Teil der Untersuchungen wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt, welche auch durch Überlassung von fotografischen Einrichtungen die Arbeiten erleichterte. Dank schulde ich auch den Herren Revierverwaltern jener Forstämter, welche mir bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials behilflich waren.

Plassmann (1927) angenommene Infektion von einem abgestorbenen Ast aus offenbar nicht den Regelfall darstellt und daß die Infektion stets zu einem Zeitpunkt eintritt, in dem der befallene Stamm oder Ast erst ein oder wenige Jahre alt ist.

Da wir im hiesigen Institut bei anderen Baumarten unsere Kenntnisse über Infektion und Ausbreitung bei Rindenerkrankungen erweitern konnten, schien es lohnend, die hier von Hopp begonnenen Arbeiten fortzusetzen und die Infektionsfrage beim Lärchenkrebs unter neuen Gesichtspunkten zu betrachten, wobei gerade die bisher nicht genügend beachteten jüngsten Befallsstadien einer genaueren Untersuchung unterzogen werden sollten. Bei diesen Arbeiten wurde mit Absicht nicht von künstlichen Infektionen, sondern ausschließlich von der anatomischen Untersuchung einer großen Zahl jüngster Befallsstellen an forstlich gepflanzten Lärchen verschiedenen Alters ausgegangen. Über die hierbei theoretisch und praktisch gewonnenen neuen Erkenntnisse soll hier berichtet werden.

1. Ort der Infektion

Wenn auch Day (1958) bei seinen Abimpfungen von Krebsstellen nur in relativ wenigen Fällen ein *Dasyscypha*-Myzel erhielt und von mancher Seite bezweifelt wird, ob *Dasyscypha Willkommii* die primäre Ursache des Lärchenkrebses ist, so scheint doch die alte Ansicht, nach welcher der genannte Pilz als Urheber der typischen Krebskrankheit der Lärche zu betrachten ist, noch keineswegs widerlegt. Im Gegenteil, je eingehender man den Krankheitsablauf erforscht, um so mehr zeigt sich, wie erstaunlich viele Parallelen zu dem Ablauf von ähnlichen Rindenerkrankungen bestehen, die zwar andere Baumarten betreffen, aber ohne Zweifel primär von bestimmten Pilzen hervorgerufen werden.

Im älteren Schrifttum wird die Ansicht vertreten, daß *Dasyscypha* nur durch Wunden in die lebende Rinde eindringt. Aber bereits Hiley (1919) und Plassmann (1927) haben darauf hingewiesen, daß der Pilz offenbar andere Wege benutzt. Hopp (1956) konnte dies bestätigen, und selbst bei den durch den Lärchengallenwickler (*Laspeyresia zebeana* Rtzb.) verursachten Schäden konnte er keine Beziehung zum Lärchenkrebs feststellen. Hiley und Plassmann vermuteten eine Beziehung zwischen Kurztrieben und Infektion, gaben jedoch verschiedene Deutungen. Die Untersuchungen von Langner (1936) stützten dann die Ansicht von Plassmann (1927), wonach der Pilz durch tote Kurztriebe in einen toten Ast einwandert und von da basipetal zum lebenden Gewebe an der Astbasis vordringt, wo es dann zur Krebsbildung kommt. Hopp (1956) hat jedoch gezeigt, daß bei dem von ihm beobachteten sehr umfangreichen Material nur bei etwa jedem sechsten Krebs ein Langtrieb („Dürrast") als Ausgangspunkt gefunden werden konnte, obwohl ein solcher doch nicht leicht übersehen werden kann. Ich selbst habe ähnliche Beobachtungen an über 100 jungen Krebsstellen gemacht und kam zu auffallend gleichen Ergebnissen.

Als Ausgangspunkt des Krebses konnten an Hand von Querschnitten in Prozent des gesamten untersuchten Materials gefunden werden:

	von Hopp	von Zycha
ein Langtrieb bei	15 %	17 %
ein Kurztrieb bei	33 %	26 %
nicht erkennbar (aber kein Langtrieb)	52 %	57 % .

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, daß eine Infektion von einem Dürrast aus zum mindesten nicht die Regel sein kann. Man beobachtet aber bei den meisten Rindenkrankheiten eine Beziehung zu einem Seitenast oder einer Knospe. Ich erinnere hier nur z. B. bei Laubbäumen an *Nectria*-Arten (Grant und Spaulding 1939) und *Dothichiza populea* (u. a. Zycha 1955 a). Ein Gleiches hat Robak (1951) für *Nectria cucurbitula* an *Abies*-Arten festgestellt. Day und Peace (1934) führen solche Erscheinungen darauf zurück, daß die Basis von jungen Knospen und Trieben in erhöhtem Maße frostempfindlich und damit besonders krankheitsanfällig ist. Robak (1951) nimmt an, daß an den genannten Stellen häufiger als anderswo durch Frost und andere Einflüsse Rindenrisse entstehen, welche den Pilzen als Eingangspforten dienen. Die Nähe einer Knospe oder eines Langtriebes kann aber auch einen anderen Grund haben. Hier liegt ja stets die Narbe des Blattes, in dessen Achsel Knospe oder Trieb wuchsen.

Wiltshire hat für den Obstbaumkrebs schon 1921 nachgewiesen, daß *Nectria galligena* durch Blattnarben einzudringen vermag. Marsh (1939) und Crowdy (1952) haben dies bestätigt, und Crosse (1956) konnte nachweisen, daß bei der Kirsche eine künstliche Infektion der Blattnarben mit *Pseudomonas mors prunorum* zu den gleichen Krankheitssymptomen führt wie eine natürliche Infektion. Auch unsere Untersuchungen an Pappeln (Schmidle 1953, Butin 1955) wiesen darauf hin, daß hier die Rindenpilze vor allem durch Blattnarben eindringen, welche zur Zeit des Blattfalles noch nicht völlig verschlossen sind.

Da entsprechende Beobachtungen an Koniferen noch nicht vorliegen, muß man sich begnügen, gestützt auf die Ähnlichkeit der Krankheitsbilder, eine Arbeitshypothese aufzustellen. Es soll daher angenommen werden, daß auch beim Lärchenkrebs der Pilz am häufigsten durch die Narben, welche die abfallenden Nadeln hinterlassen, eindringt. Von diesem Gedanken ausgehend, soll der weitere Ablauf der Infektion und der Erkrankung überhaupt betrachtet werden, wobei auch zu prüfen ist, ob sich etwa Widersprüche ergeben.

2. Zeit der Infektion

Wie den Infektionsort, kann man auch versuchen, die Infektionszeit dadurch zu ermitteln, daß man die Stadien des Zuwachses und der Wundbildung mit Hilfe anatomischer Untersuchungen möglichst weit zurück ver-

Abb. 1. Entwicklung einer Krebswunde vom 1. Befallsjahr (Triebalter 2 Jahre) an. Hell punktiert: lebende Rinde. Dichter punktiert bzw. schwarz: Zonen der abgestorbenen Rinde

folgt. Dies ist in der Rinde nur beschränkt möglich, gut aber im Holz, da hier die Jahrringbildung ein unveränderliches Zeugnis hinterläßt. Seit langem weiß man, daß beim Baumkrebs die Ausbreitung nicht kontinuierlich erfolgt, sondern schubweise während der jährlichen Vegetationsruhe des Baumes. Daher ist an und in der Nähe jeder Krebswunde der Jahrring entweder bis zum letzten Spätholz fertiggestellt, oder der Zuwachs fehlt hier völlig. Abbildung 1 zeigt die Entwicklung eines jungen Krebses schematisch, und man erkennt, daß in diesem Falle die Schädigung nach Abschluß des zweiten Wachstumsjahres erfolgt ist. Aus praktischen Gründen spricht man erst dann vom Haften einer Infektion, wenn eine lokale Schädigung des Kambiums eingetreten ist. Vergleicht man das Zahlenmaterial, welches über das Triebalter zum Zeitpunkt des Haftens der Infektion, also des Krebsbeginnes, bis jetzt vorliegt, so erhält man folgende Werte:

Von allen untersuchten Krebsen begann die Krankheit

am Ende des Triebalters (Jahre)	nach: HILEY	HOPP	ZYCHA
1	bei 4 %	2 %	3 %
2	29 %	16 %	44 %
3	28 %	31 %	24 %
4	21 %	20 %	17 %
5	10 %	13 %	8 %
über 5	8 %	18 %	4 %.

Es konnte somit die von Hopp (1956) bereits gemachte Erfahrung bestätigt werden, daß eine Krebsinfektion nur bei jungen Trieben erfolgt. Wenn Hopp bei 18 % der Krebse einen Beginn der Krankheit in einem Triebalter von über 5 Jahren feststellte, so ist diese Zahl deshalb so hoch, weil hierin zahlreiche alte Krebse eingeschlossen sind, welche an einem Seitenast entstanden waren, erst nach mehrjährigem Wachstum auf den Stamm übergriffen und dann als Stammkrebse bewertet wurden. Der von mir gefundene auffallend hohe Anteil von Krebsen, welche nach dem zweiten Jahre entstanden, erklärt sich daraus, daß von mir viele sehr junge Krebsstadien untersucht wurden, welche äußerlich vielfach als solche noch kaum zu erkennen sind und von Hopp möglicherweise übersehen wurden.

Wenn die aufgestellte Arbeitshypothese richtig ist, so kommen als Eingangspforten für den Pilz die Narben der Einzelnadeln der Langtriebe und die des Nadelkranzes der Kurztriebe in Frage. Da jeder Kurztrieb eine große Zahl dicht beieinander liegender Narben aufweist, ist es verständlich, daß Kurztriebe als häufige Ausgangspunkte der Erkrankung nachgewiesen wurden, und da solche Kurztriebe vielfach mehrere Jahre als solche erhalten bleiben, ist es verständlich, daß auch etwa von dem Narbenkranz des zweiten oder dritten Jahres Infektionen ausgehen können. An älteren Ästen oder Stämmen sind aber belaubte Kurztriebe selten, so daß hier auch nur in seteneren Fällen ein Erkrankungsbeginn festzustellen ist.

Betrachtet man das erste Stadium einer Krebswunde, wie es in Abbildung 1 oben wiedergegeben ist, so stellt man fest, daß eine bestimmte Rindenpartie nach Abschluß der zweiten, aber vor Beginn der dritten Vegetationsperiode des Triebes abgetötet worden ist. Der Pilz muß also spätestens in dieser Zeit eingedrungen sein. Marsh (1939), Crowdy (1952) und Crosse (1956) gelangen beim Obstbaumkrebs künstliche Infektionen an Blattnarben nur während des kurzen Zeitraumes zwischen dem Blattwurf und der völligen Fertigstellung des Narbenverschlusses, was allerdings beim Apfel nur einen Tag (Crowdy 1952) dauert. Von den gleichen Forschern wurde aber beobachtet, daß auch im Frühjahr während einer gewissen Zeit wieder Narbeninfektionen gelingen. Sie führen dies auf geringfügige Risse zurück, welche durch das beginnende Wachstum mechanisch entstehen sollen. Die Beobachtungen von Gremmen (1958) an der Pappel weisen aber darauf hin, daß zu diesem Zeitpunkt die von abfallenden Knospenschuppen hinterlassenen Narben den Pilzen als Eingangspforten dienen können. Keine der von verschiedenen Seiten angestellten Beobachtungen spricht dagegen, daß etwa beim Lärchenkrebs die Infektion in ganz ähnlicher Weise erfolgt.

3. Ausbreitung des Pilzes in der Rinde

Dringt der Pilz über Nadelkissen und Kurztrieb ein, so kann er sich von hier aus in der Astrinde so lange ausbreiten, bis ein Wundperiderm, welches erfahrungsgemäß die meisten Pilze mechanisch aufhält, ihm Einhalt gebietet. Langner (1936) glaubte die Art des Vordringens des Pilzes in der

Rinde nur dadurch erklären zu können, daß das gesunde Rindengewebe durch Pilzausscheidungen frostempfindlich wird, dann im Winter erfriert und erst in diesem schwer geschädigten Zustande vom Pilz durchwachsen werden kann. Versuche, welche HAHN und AYERS (1943) sowie MANNERS (1956) anstellten, ergaben jedoch, daß auch in frostfreien Lagen ein typischer Lärchenkrebs entstehen kann, und meine anatomischen Untersuchungen zeigten, daß ein Frostring im Holz an oder in der Nähe von Krebswunden nur selten zu finden ist. Andererseits ist GÄUMANN (1951) der Ansicht, daß ein Demarkationsgewebe die gesunde Rinde vor dem Vordringen der Toxine schützt, ein Problem, zu dem sich LANGNER seinerzeit nicht äußerte. Selbst wenn aber die von LANGNER postulierten, die Frostresistenz herabsetzenden Toxine durch das Wundperiderm (= Demarkationsgewebe) diffundieren, so müßten sie sich oft auf sehr weite Strecken auswirken, was aber auch wieder nicht sehr wahrscheinlich ist.

Abb. 2. Triebspitzen, abgestorben nach Schädigung der Rinde an der Basis. Links und Mitte: *Argyresthia laevigatella.* Rechts: *Dasyscypha Willkommii*

Bei Rindeninfektionen an anderen Bäumen ist ein reiches Beobachtungsmaterial zusammengetragen worden, welches ein einfaches, klares Bild ergibt und wohl für die Lärche ebenfalls als zutreffend erachtet werden kann, wenn man hier auch auf viele Indizien angewiesen ist. Nimmt man an, daß LANGNER bei seinen Versuchen, lebendes Rindengewebe von *Dasyscypha* bewachsen zu lassen, die Ausbildung der ersten, aber bereits hemmenden Stadien der Demarkationsgewebe übersehen hat, was bei der Lärche leichter möglich ist als etwa bei der Pappel, so ergibt sich aus seinen negativen Ergebnissen kein Widerspruch zu den hier vertretenen Ansichten, nach denen *Dasyscypha Willkommii* doch wohl als Perthophyt zu betrachten ist.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß auch bei der Lärche im Freien das Wundperiderm, welches die von *Dasyscypha* befallene Rinde von der gesunden trennt (Abb. 4), zu Beginn der Vegetationszeit im Frühjahr angelegt wird. An welcher Stelle dies erfolgt, d. h. also wie umfangreich die Krebswunde ist, hängt von den Außenbedingungen ab, da sich ein Gleichgewicht zwischen Pilzwachstum und Reaktion der Wirtspflanze einstellt, wie dies in verschiedenen ähnlichen Fällen schon erforscht wurde.

Abb. 3. Krebswunde um Kurztrieb (↓). Ast von 1956, Schadstelle Ende Jahrring 1957 90°, 1958 überwallt bis auf 40°; Frühjahr 1959 Schadstelle 360°, Ast oberhalb abgestorben. Aufn. 28. 5. 1959

So fand schon Lauritzen (1934) bei einer Gladiolenkrankheit, daß Kühle und Feuchtigkeit die Infektion fortschreiten lassen, während bei wärmerer Lagerung eine Peridermbildung die Ausbreitung hemmt. Ähnliche Beobachtungen haben auch Hermann (1956) und Butin (1957) bei *Dothichiza* und Pappel gemacht. Dabei spielt aber offenbar auch die Turgeszenz des Rindengewebes eine wichtige Rolle. Bei Pappeln fand Schmidle (1955), daß künstliche Infektionen schneller von der Pflanze abgeriegelt werden, wenn man die Wunde mit feuchter Watte umgibt. Weiter stellten Butin (1957) und Bier (1959) fest, daß ein bestimmter Wasserverlust die Abwehrbereitschaft des Rindengewebes von Pappeln und Weiden herabsetzt.

Dementsprechend findet man alle Übergänge zwischen Krebswunden, welche nur unbedeutend sind, und solchen, welche den ganzen Umfang erfassen und damit den Trieb ringeln. Das einmal im Frühjahr gebildete Wundperiderm wird während der Vegetationszeit von keinerlei Nekroseerscheinungen überschritten. Nur mechanische Beschädigungen der Rinde, wie sie etwa durch Insektenfraß verursacht werden, können die Bildung eines neuen Wundperiderms veranlassen. Da die Rinde der jungen Lärchentriebe nur schmal ist,

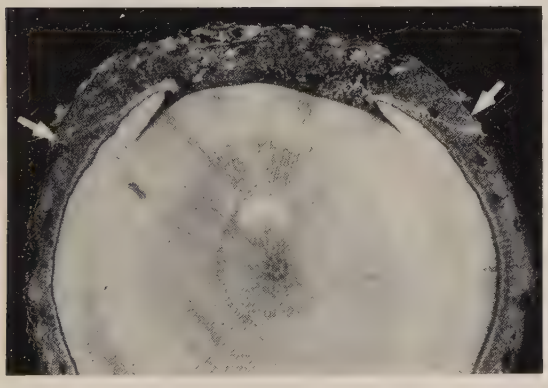


Abb. 4. Krebswunde an der Jahresgrenze 1955/56. Demarkationsgewebe (↓) als helleres Band zwischen lebender und toter Rinde erkennbar. Aufn. 10. 7. 1956

stirbt stets die ganze Rinde mit der zugehörigen Kambiumzone ab. An der Grenze von Holz und Rinde kann daher auch kein Wundperiderm gebildet werden.

Während bei Krankheiten, die wir als „Rindenbrand" („annual canker") bezeichnen (ZYCHA 1955 b), mit der Ausbildung des Demarkationsgewebes die Wundstelle für dauernd begrenzt ist und der pathogene Pilz nur in besonderen Fällen aus der Begrenzung auszubrechen und weiteres Rindengewebe zu befallen vermag, erfolgt ein derartiger „Ausbruch" beim Lärchenkrebs jedes Jahr nach Abschluß der Vegetationsperiode von neuem. Nur in seltenen Fällen unterbleibt dieser Ausbruch, was dann zu einer Überwallung und schließlich zu einem „geschlossenen Krebs" führen kann. Alle Beobachtungen an solchen Demarkationsgeweben sprechen dafür, daß diese nicht von Pilzen durchbrochen werden können. Manche Forscher nahmen daher an, daß das weitere Wachstum des Pilzes über das Holz erfolgt. Das würde bedeuten, daß der in der toten Kambialzone verbliebene Pilz von hier aus den Wundrand des neu gebildeten Jahrringes abtötet und über das Kambium in die Rinde eindringt, die an allen anderen Stellen durch ein Korkabschlußgewebe geschützt ist. Ob diese Ansicht richtig ist oder ob im Winter infolge von Spannungen, welche das ungleichmäßige Wachstum an der Krebswunde mit sich bringt, Risse im Periderm oder an seiner Grenze entstehen, welche dem Pilz Eingangspforten in die gesunde Rinde eröffnen, ist noch völlig ungeklärt. Fest steht nur, daß der Pilz anschließend an die vorjährige Wunde wiederum je nach den Außenbedingungen mehr oder weniger weit vordringt, bis im folgenden Frühjahr abermals ein Wundperiderm der Ausbreitung eine Grenze setzt (Abb. 1).

4. Bemerkung zur Frage der Pilzrasse

Für den Ablauf der hier besprochenen Infektion und Erkrankung spielt die Frage der Pilzrasse keine Rolle. Dennoch soll auf die Beobachtungen von ROBAK (1952) kurz eingegangen werden, der feststellte, daß man auf Lärche zwei Formen von *Dasyscypha* findet, welche man aber nicht als getrennte Arten, sondern als Rassen von *D. Willkommii* bezeichnen sollte. Diese unterscheiden sich in Reinkultur durch verschiedene Myzelformen, in der Natur aber vor allem durch die Größe der Askosporen. Die eine Rasse fand er stets an Krebsstellen; die Länge der Askosporen betrug hier bei den vier Herkünften 21,7, 22,1, 22,2 und 22,2 μ. Apothezien an krebsfreien Zweigen der gleichen Herkünfte ergaben als mittlere Werte für die Sporenlänge 18,3, 18,7, 19,4 und 19,8 μ. Im August 1957 wurden von mir entsprechende Messungen vorgenommen. Mittelwerte von je 100 Sporen aus 7 Apothezien von einer Krebsstelle ergaben eine Sporengröße von 21,5 $\times$ 8,4 μ. 5 Apothezien an „krebsfreien" Zweigen ergaben Sporengrößen von 18,8 $\times$ 8,0 μ. Diese Werte stimmen somit mit den Beobachtungen ROBAKS ebenso überein wie der Größenunterschied zwischen Krebssporen und anderen, welcher bei ROBAK 16 %, hier 14 % beträgt. Da die Infektionsergebnisse von ROBAK keine eindeutigen Ergebnisse zeigten, bedarf diese Rassenfrage noch einer weiteren Nachprüfung. Gegen einen genetischen Unterschied der beiden Formen scheint mir jedoch folgende Beobachtung zu sprechen.

An schwächeren Trieben, bei welchen eine *Dasyscypha*-Infektion bald den ganzen Umfang erfaßt und damit den über der Befallsstelle gelegenen Triebteil zum Absterben bringt, beobachtet man, daß sich der Pilz von der Befallsstelle aus in den absterbenden Teil hinein schnell ausbreitet und hier im folgenden Jahr Apothezien bildet. Wenn dann etwa der basale Teil dieses Triebes z. B. wegen Beschattung oder dergleichen abstirbt, so dringt

der Pilz auch hierin vor, und die ursprüngliche Infektionsstelle ist dann kaum noch zu erkennen. An anscheinend krebsfreien Ästen mit Apothezien konnte fast immer eine derartige primäre Infektionsstelle nachgewiesen werden. Nur dort, wo die Ernährung der Rinde besser ist, kommt es zur Bildung von Überwallungswülsten und damit zur Entwicklung der auffälligen Krebsbeulen, welche die großsporigen Apothezien tragen. Findet man Apothezien an einem Ast abseits solcher Krebsbeulen, so ist es leichter zu verstehen, daß der Pilz hier von einer geringfügigen Krebswunde ausgegangen ist, als daß hier eine andere Pilzrasse stets zufällig neben der eigentlichen Krebsrasse den Zweig befallen hat. Das unterschiedliche Verhalten in der Kultur und die unterschiedlichen Sporengrößen könnten als Ernährungsmodifikationen erklärt werden, wie wir solche bei Pilzen ja nicht selten finden, wenn auch deren Stabilität verschieden sein mag.

Abb. 5. Krebsbefall an Basis von einjährigem Seitenast. Aufn. 4. 6. 1956

5. Der Ablauf der Krebserkrankung in neuer Sicht

Die hier dargelegten Erkenntnisse und Gedankengänge veranlaßten mich, Infektion und Krankheitsablauf beim Lärchenkrebs anders zu erklären, als dies bisher erfolgt ist, so daß sich das folgende Bild ergibt.

Der Pilz dringt in der Regel im Herbst über die Narben der abfallenden Nadeln in die Rinde ein. Da die Kurztriebe sehr dicht benadelt sind, ist hier die Wahrscheinlichkeit einer Infektion besonders groß. Dementsprechend beobachtet man, daß nach dem ersten Nadelwurf der Kurztriebe, also am Ende des zweiten Triebjahres, ein Krebsbeginn am häufigsten ist. Möglicherweise kommen auch Frühjahrsinfektionen im Bereich der Knospen vor. Der Pilz könnte dann latent (vgl. Day 1958) auf kleinem Areal den Sommer überdauern und im folgenden Herbst in der Rinde vordringen. Eine Wetterlage während des Nadelfalles, welche für Sporenwurf und Sporenkeimung günstig ist, den völligen Abschluß der Abwurfstellen aber verzögert, dürfte die Infektion fördern.

Der Pilz breitet sich sodann in der Rinde aus, bis ihm zu Beginn der Vegetationszeit durch die Bildung eines Demarkationsgewebes das weitere Vordringen unmöglich gemacht wird. Wo diese Barriere liegt, hängt von jenen Faktoren ab, welche das Gleichgewicht zwischen Pilzwachstum und Abwehrreaktion bestimmen, also von klimatischen Bedingungen und von der Wuchsfreudigkeit des befallenen Triebes, die verständlicherweise um so geringer wird, je mehr Krebsstellen den Nährstoffstrom stören. Diese erste Befallszone erfaßt nur in seltenen Fällen den ganzen Umfang des Triebes. Der gesund gebliebene Teil vermag dann in der folgenden Vegetationsperiode einen neuen Jahrring zu bilden, welcher je nach dem Grad des Zuwachses die entstandene Wundstelle mehr oder weniger überwallt.

Abb. 6. Krebswunde um Kurztrieb, welche am Rande einen Langtrieb einzuschließen beginnt. Ast von 1954, Schadstelle Ende Jahrring 1957 320°, 1958 überwallt bis auf 180°; Frühjahr 1959 Schadstelle 360°, Ast oberhalb der Befallsstelle abgestorben. Aufn. 28. 5. 1959

Als Maß für die Größe des Schadens nimmt man am besten den dem befallenen Teil des Umfanges zugehörigen Winkel. Die Ausdehnung der Wunde in axialer Richtung braucht dabei nicht besonders berücksichtigt zu werden, da HOPP (1957) gezeigt hat, daß sich Breiten- zu Längenausdehnung fast stets wie 1 : 2 verhalten.

	Ausmaß der ersten Schädigung			
	bis 90°	91—180°	181—270°	über 270°
	Gesamtanteil (Prozent)			
	37	29	23	11
Nach einem Jahr sind davon überwallt (Prozent)				
vollständig	58	28	0	0
bis auf weniger als 90°	42	65	36	0
bis auf 91 bis 180°	—	7	55	9
bis auf 181 bis 270°	—	—	9	18
bis auf über 270°	—	—	—	73

Wie die Tabelle zeigt, ist der Umfang der Schädigung im ersten Befallsjahre bereits ausschlaggebend für den weiteren Ablauf der Erkrankung. Erfaßt die erste Schädigung mehr als etwa den halben Umfang des Triebes, so stirbt er, wenn er sich nicht durch besonders kräftiges Wachstum auszeichnet, meist nach der nächsten oder übernächsten Vegetationsperiode oberhalb der Befallsstelle ab. Dies tritt stets im Frühjahr während des Austriebes der Knospen in Erscheinung, wobei die noch nicht fertigen Nadeln vertrocknen. Erfolgt diese meist nicht genügend beachtete Spitzendürre zu Beginn des zweiten oder dritten Triebjahres, so zeigt sich äußerlich das gleiche Bild wie

bei einem Befall durch die Lärchentriebmotte (*Argyresthia laevigatella* H. S.), wie Abbildung 2 zeigt. Die Beurteilung einer Spitzendürre an jungen Trieben erfordert daher stets eine genaue Untersuchung.

Die Triebmotte hinterläßt deutliche Fraßstellen in der Rinde und manchmal auch am Holz, wobei hier stets beim weiteren Holzzuwachs eine große Zahl von Harzkanälen angelegt wird, was man bei *Dasyscypha*-Befall nicht findet. Hier sei jedoch darauf hingewiesen, daß man an und in der Nähe von Krebsstellen in dem vor dem ersten Rindenschaden angelegten Jahresring gelegentlich — von mir bei 20 % der untersuchten Schadstellen beobachtet — ein tangentiales Band von Parenchymzellen etwa in der Mitte des Jahresringes, also zwischen Früh- und Spätholz, findet, dessen Bedeutung noch nicht ermittelt werden konnte.

Daß man keine von den Fraßstellen des Insektes ausgehenden *Dasyscypha*-Infektionen findet, hat seinen Grund wahrscheinlich darin, daß diese Beschädigungen nur während der Vegetationszeit erfolgen, in der die Pflanzen erfahrungsgemäß in der Lage sind, die Wundstelle durch ein Demarkationsgewebe abzugrenzen. Daß Hahn und Ayers (1943) Infektionsversuche mit *Dasyscypha* im Sommer besonders schlecht gelangen, mag als Beweis für diese bei anderen Baumarten inzwischen mehrmals beobachtete Tatsache gelten.

Ist der Trieb über der Befallsstelle abgestorben, so vermag der Pilz in diesem Teil schnell vorzudringen, während er sich basipetal nur langsam ausbreitet, wie es der jährlichen Vergrößerung der Krebswunde (siehe Hopp 1957) entspricht.

Liegt die Infektionsstelle nahe der Basis des Zweiges, so greift die Krebswunde früher oder später auf den Trieb nächst niedriger Ordnung über, und es kommt hier, wo meist der Durchmesser größer und die Ernährungsverhältnisse günstiger sind, zu einer typischen Krebsausbreitung (Abb. 7). Hier umfaßt dann die Krankheit bald den ganzen Umfang der Astbasis, so daß dieser Ast abstirbt. Merkwürdigerweise wurde beim Lärchenkrebs, wie auch bei ähnlichen Erkrankungen anderer Baumarten, meist übersehen, daß hier nicht zuerst der Ast abstirbt und dann an seiner Basis der Rindenschaden beginnt, sondern daß zuerst der Rindenschaden vorhanden ist und erst sekundär der Ast abstirbt. Schon allein aus diesem Grunde kann die Theorie von der Infektion vom Dürrast her (Plassmann 1927) nicht aufrechterhalten werden.

Abb. 7. Drei Krebswunden (↓) an der Basis mehrjähriger Seitenäste. Aufn. 3. 7. 1956

Am Ende der ersten Vegetationsperiode nach dem Beginn der Schädigung ist die Wundstelle von den Rändern her mehr oder weniger weit überwallt. In der folgenden Ruheperiode dringt der Pilz auf zunächst noch unbekanntem Wege wieder in die gesunde Rinde vor, wobei sich das gleiche vollzieht wie bei der ersten Schädigung. Auffallend ist dabei, daß auch dann, wenn die Befallsstelle nur

klein war und im ersten Jahre völlig überwallt worden ist, im folgenden Jahre doch stets ein neuer Ausbruch der Krankheit beobachtet wird. In der folgenden Zeit vollzieht sich dann jährlich die gleiche Erscheinung, deren Umfang und Schadwirkung vor allem von der Wuchsfreudigkeit des Baumes abhängt.

Betrachtet man in der dargestellten Weise den Ablauf der Lärchenkrebserkrankung, so ergibt sich ein klares Bild, dem sich alle im Laboratorium und in der Praxis gemachten Beobachtungen zwanglos einfügen lassen.

Es bleibt noch übrig, der japanischen Lärche (*Larix leptolepis* Gord.) ein Wort zu widmen. Es ist bekannt, daß an dieser Baumart typische Lärchenkrebse bisher nicht gefunden worden sind. Andererseits findet man aber auf trockenen Ästen der japanischen Lärche gar nicht selten Apothezien von *Dasyscypha Willkommii*, und HAHN und AYERS (1943) gelangen auch künstliche Infektionen. Ich selbst habe an jungen japanischen Lärchen gelegentlich Infektionen von *Dasyscypha Willkommii* nachweisen können, doch handelte es sich stets um junge, schwachwüchsige Triebe, welche bald darauf abstarben, so daß es zu keinen deutlichen Überwallungserscheinungen und damit nicht zur typischen Krebsbildung kam. Es ist anzunehmen, daß der auf den trockenen Ästen zu findende Pilz den gleichen Weg in die Rinde genommen hat wie bei den entsprechenden Ästen der europäischen Lärche. Warum man aber bei der japanischen Lärche zwar junge Infektionen, aber keine ältere Krebsbildung findet, bedarf noch der Untersuchung.

Sicher ist bezüglich der Infektion beim Lärchenkrebs das letzte Wort noch nicht gesprochen, und mancher Beweis wird noch erbracht werden müssen, ehe vor allem auch für die forstliche Praxis Verbindliches wird ausgesagt werden können. Trotzdem glaubte ich die hier wiedergegebenen Beobachtungen und Vergleiche mitteilen zu müssen, da sich vielleicht daraus neue Impulse für die so dringende Lärchenkrebsforschung ergeben könnten.

Zusammenfassung

Auf Grund von anatomischen Untersuchungen und von Vergleichen mit ähnlichen Erkrankungen an anderen Baumarten wird ein Bild von der durch *Dasyscypha Willkommii* hervorgerufenen Erkrankung der Lärche entwickelt, welches in verschiedenen Punkten die bisher in der Literatur vertretenen Ansichten über den Infektionsgang widerlegt.

Summary

Anatomical studies and a comparison with similar diseases on other tree species have given an idea of infection of Larch by *Dasyscypha Willkommii*, differing from the opinion hitherto discussed in the literature.

Literaturverzeichnis

Bier, J. E., 1959: The relation of bark moisture to the development of canker diseases caused by native facultative parasites. I. *Cryptodiaporthe* canker on willow. Canad. J. Bot. **37**, 229—238.

Butin, H., 1955: Über den Einfluß des Wassergehaltes der Pappel auf ihre Resistenz gegenüber *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. Phytopath. Z. **24**, 245—264.

— —, 1957: Untersuchungen über Resistenz und Krankheitsanfälligkeit der Pappel gegenüber *Dothichiza populea* Sacc. et Br. Phytopath. Z. **28**, 353—374.

Crosse, J. E., 1956: Bacterial canker of stone-fruits. II. Leaf scar infection of cherry. J. Horticult. Sci. **31**, 212—224.

Crowdy, S. H., 1952: Oberservations on apple canker. IV. The infection of leaf scars. Ann. appl. Biol. **39**, 569—580.

Day, W. R., 1958: The distribution of mycelia in European larch bark, in relation to the development of canker. Forestry (Oxford) **31**, 63—86.

— —, and T. R. Peace, 1934: The experimental production and the diagnosis of frost injury on forest trees. Oxford Forestry Mem. **16**, 60 S.

Gaisberg, E. von, 1928: Beiträge zur Biologie des Lärchenkrebspilzes *Dasyscypha Willkommii* Hrtg. Mitt. Württ. Forstl. Vers. Anst. **1**, 1—24.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Basel, 2. Aufl.

Grant, T. J., and P. Spaulding, 1939: Avenues of entrance for canker-forming *Nectrias* of New England hardwoods. Phytopathology **29**, 351—358.

Gremmen, J., 1958: Bijtrage tot de Biologie van *Cryptodiaporthe populea* (Sacc.) Butin (*Dothichiza populea* Sacc. et Bri.). Nederl. Bosb. T. **30**, 251—260.

Hahn, G. G., and T. T. Ayers, 1943: Role of *Dasyscypha Willkommii* and related fungi in the production of canker and die-back of larches. J. For. Washington, **41**, 483 bis 495.

Hermann, G., 1956: Beiträge zur Physiologie von *Dothichiza populea* Sacc. et Briard und *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. im Hinblick auf deren parasitisches Verhalten. Diss. Göttingen.

Hiley, W. E., 1919: The Fungal Diseases of the Common Larch. Oxford.

Hopp, P. J., 1956: Beiträge zur Kenntnis des durch *Dasyscypha Willkommii* (Hartig) verursachten Lärchenkrebses. Diss. Göttingen.

— —, 1957: Zur Kenntnis des Lärchenkrebses (*Dasyscypha Willkommii* [Hartig] Rehm an *Larix decidua*). Forstw. Cbl. **76**, 321—384.

Langner, W., 1936: Untersuchungen über Lärchen-, Apfel- und Buchenkrebs. Phytopath. Z. **9**, 111—145.

Lauritzen, J. I., 1934: Factors affecting *Gladiolus* in storage. J. Agric. Res. **48**, 265—282.

Manners, J. G., 1956: Continued studies on the relationships between larch canker and *Trichoscyphella willkommii*. Rep. on forest research for the year ended March 1955, 78—79, London.

Marsh, R. W., 1939: Observations on apple canker. II. Experiments on the incidence and control of shoot infections. Ann. appl. Biol. **24**, 458.

Plassmann, E., 1927: Untersuchungen über die Pilzgattung *Dasyscypha* mit besonderer Berücksichtigung von *D. Willkommii*. Diss. Hann. Münden.

Robak, H., 1951: Some observations contributing to the study of connections between climatical damages and fungus attacks on Conifers. Medd. Vestl. Forstl. Forsöksst. **8**, 1—43.

— —, 1952: Om saprofyttiske og parasittiske raser av lerkekreftsoppen, *Dasyscypha Willkommii* (Hart.) Rehm. Medd. Vestl. Forstl. Forsöksst., Bergen, No. **29**, 117—211.

Schmidle, A., 1953: Die *Cytospora*-Krankheit der Pappel und die Bedingungen für ihr Auftreten. Phytopath. Z. **21**, 83—96.

— —, 1955: Über Infektionsversuche mit *Septotis populiperda* Waterman et Cash an *Populus deltoides*. Angew. Bot. **29**, 14—25.

Wiltshire, S. P., 1921: Studies on the apple canker fungus. I. Leaf scar infections. Ann. appl. Biol. **8**, 182.

Zycha, H., 1955 a: Krankheiten der Pappel. Brühler Pappel-Vorträge, 66—77, Hannover.

— —, 1955 b: Definition von Rindenbrand und Krebs bei Waldbäumen. Meded. Landbouwhogeschool Opzoekingstat. v. d. Staat te Gent. Teil 20 No. 3, 411—418.

Aus dem Biologischen Institut des VEB Fahlberg-List, Magdeburg SO

Über den Wirkungsmechanismus von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) bei der Keimhemmung der Kartoffeln[1])

Von

W. Nultsch

Mit 17 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — I. Der Einfluß der Carbamate auf Keimfähigkeit, Wachstum und Ernteertrag der Kartoffeln. 1. Die Beeinflussung des Längenwachstums der Wurzeln. 2. Einfluß von Wirkstoffkonzentration und Behandlungsdauer auf die Keimfähigkeit und das Sproßwachstum der Kartoffeln. 3. Freilandversuche. — II. Versuche zur Frage der Wirkungsmechanik. 1. Die toxische Wirkung der Carbamate auf die Augen und Keime der Kartoffeln. 2. Morphologische Veränderungen an Sprossen und Wurzeln nach IPC-Einwirkung. 3. Cytologische Untersuchungen. 4. Zur Frage der biochemischen Ursachen der IPC-Wirkung. — Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

Während Berichte über die praktische Anwendung der N-Phenylcarbamate als Keimhemmungsmittel für Kartoffeln bereits in größerer Zahl vorliegen (vgl. Nultsch 1959 a), ist über ihre Wirkungsweise und alle damit im Zusammenhang stehenden Fragen bis heute nur wenig bekannt. Nach den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Nultsch 1958, 1959 c) fungieren Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) und Äthyl-N-phenylcarbamat (ÄPC) nicht, wie Dettweiler (1948, 1952 a, b) annimmt, als spezifische Inhibitoren der Atmungsfermente der Kartoffel. Sie beeinflussen die Aktivität der Polyphenoloxydase, der Ascorbinsäureoxydase und Cytochromoxydase nicht, und die Dehydrasen hemmen sie erst in verhältnismäßig hohen, bereits cytotoxisch wirkenden Konzentrationen, die unter praktischen Bedingungen im Gewebe der Kartoffelknollen nachweislich nicht erreicht werden. Eine spezifische Fermenthemmung scheidet daher als wirksames Prinzip der Keimhemmung aus.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das IPC weder in biologisch wirksamer noch in chemisch nachweisbarer Menge vom Gewebe der damit behandelten Kartoffelknollen aufgenommen wird (Nultsch 1959 b). Die Ur-

[1]) Herrn Prof. Dr. J. Buder zum 75. Geburtstag gewidmet.

sache der Keimhemmung ist also nicht in einer Störung der bei der Keimung im Knolleninneren ablaufenden physiologischen Prozesse zu suchen. Vielmehr kann sich der Angriff der Carbamate nur gegen die Augen bzw. Keime selbst richten, deren Wachstum sie verlangsamen oder gar unterbinden.

Der Einfluß dieser auch als Herbizide angewandten Verbindungen auf das Pflanzenwachstum ist bereits mehrfach untersucht worden. Dagegen liegt eine genauere Analyse der an den Organen der Kartoffel verursachten Wachstumshemmung bisher nicht vor. Sie ist das Thema des ersten Abschnittes dieser Arbeit. Im Zusammenhang damit wurde auch die Frage aufgegriffen, ob die Carbamate für die Behandlung von Pflanzgut geeignet sind. DETTWEILER (1948, 1952a, b) hatte als erster die Anwendung derartiger Mittel bei Saatkartoffeln empfohlen, und auch HOFFERBERT (1948), QUANTZ (1948, 1949), RHODES, SEXTON, SPENCER und TEMPLEMAN (1950), SCHULZE, FISCHNICH, WOLLNER und GORSLER (1951) und FISCHNICH und Mitarbeiter (1951, 1956) halten sie für möglich oder doch nicht für ganz ausgeschlossen. JACOB (1952) hat dagegen bereits gewisse Bedenken geltend gemacht, und PERLASCA (1956) hält sie für ungeeignet zur Saatgutbehandlung. Auch die Praxis lehnt heute auf Grund mancher Mißerfolge die Anwendung der Carbamate als Keimverzögerungsmittel für Pflanzkartoffeln allgemein ab, ohne daß damit allerdings dieses Problem als prinzipiell geklärt angesehen werden könnte. Eine befriedigende Antwort auf diese Frage setzt die Kenntnis des Wirkungsmechanismus dieser Verbindungsklasse voraus, dessen Untersuchung daher den Gegenstand des zweiten Teiles der vorliegenden Arbeit bildet[1]).

I. DER EINFLUSS DER CARBAMATE AUF KEIMFÄHIGKEIT, WACHSTUM UND ERNTEERTRAG DER KARTOFFELN

1. Die Beeinflussung des Längenwachstums der Wurzeln

Zur exakten quantitativen Ermittlung der wachstumshemmenden Wirkung der zu prüfenden Verbindungen bedienten wir uns der Wurzelwachstumsteste, die sich experimentell verhältnismäßig leicht handhaben lassen und Werte von hinreichender Genauigkeit liefern (SEGELITZ 1938, MOEWUS 1949, SÖDING 1952). Während die Hauptversuche mit Kartoffelwurzeln durchgeführt wurden, benutzten wir als Vorprüfung den Kressetest nach MOEWUS (1949). Hinsichtlich der Methodik sei auf diese Arbeit verwiesen.

Erwartungsgemäß zeigten beide Substanzen eine mit steigender Konzentration zunehmende Wachstumshemmung der Kressewurzeln. Trägt man die ermittelten Werte in ein Wahrscheinlichkeitsnetz ein (Abb. 1), so erhält man Wirkungsgeraden, die mit der Abszisse etwa die gleichen Neigungswinkel bilden, und zwar 27 ° im Falle des ÄPC, 26,5 ° im Falle des IPC. Aus diesem Verhalten kann man, nach den heute geltenden Anschauungen über das Aussagevermögen derartiger DR-Kurven (dosage-response-Kurven), die

[1]) Für zuverlässige Mitarbeit habe ich meinen technischen Assistentinnen Frl. I. AMELUNG, Frau H. BARTH und Frau S. NOWOTZIN, für die Anfertigung der photographischen Abbildungen Herrn R. HERRMANN zu danken.

Gleichheit des Wirkungsmechanismus der beiden Substanzen folgern, was allerdings bei ihrer engen chemischen Verwandtschaft nicht überrascht. Infolge des linearen und fast parallelen Verlaufes der Wirkungskurven ist es auch möglich, die zwischen beiden Verbindungen bestehenden Wirkungsunterschiede exakt zu berechnen. Als Vergleichsgröße mag, dem allgemein üblichen Modus folgend, die ED 50 dienen, d. h. die Substanzmenge, deren Applikation eine 50%ige Wachstumshemmung zur Folge hat. Sie liegt für ÄPC bei $3{,}2 \cdot 10^{-4}$ mol, für IPC bei $2{,}6 \cdot 10^{-4}$ mol. Setzen wir die erforderliche IPC-Menge gleich 100, so beträgt die entsprechende ÄPC-Menge 123 %, d. h. mit anderen Worten, daß die Wirksamkeit des IPC im Kressetest um etwa 1/4 größer ist als die des ÄPC.

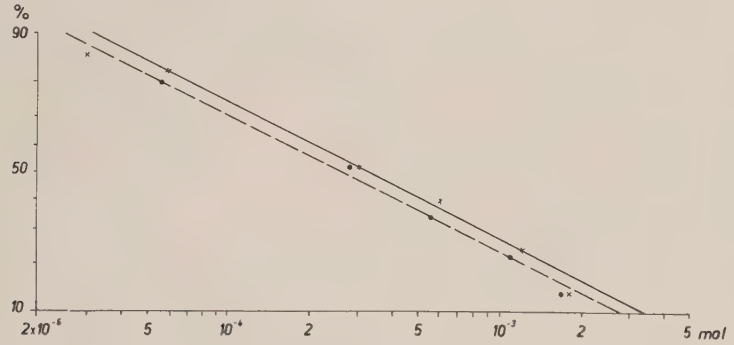


Abb. 1. Darstellung der im Kressetest ermittelten Wirkungskurven im Wahrscheinlichkeitsnetz. ÄPC: Kreuze und ausgezogene Linie; IPC: Punkte und gestrichelte Linie. Abszisse: Konzentration in mol Liter; Ordinate: Längenzuwachs in Prozent der Kontrolle

Analoge Versuche führten wir mit Kartoffelwurzeln durch. Hierzu bedienten wir uns einer Versuchsanordnung, die sich im Prinzip an den Kressetest anlehnt, in den Einzelheiten jedoch dem andersartigen Versuchsobjekt angepaßt ist.

Zur Anzucht des Versuchsmaterials wurden einige kleinere Kartoffeln in Holzkästen mit gut angefeuchtetem Sägemehl ausgelegt und 2 bis 4 Tage im Gewächshause bei 20 °C vorgekeimt. Hatte die Mehrzahl der Wurzeln eine Länge von 1 bis 3 cm erreicht, entnahmen wir die Kartoffeln dem Keimbett und spülten sie unter der Wasserleitung gut ab. Dann wurden sie für 2 oder 4 Stunden in die zu prüfenden Lösungen eingelegt, und zwar so, daß alle Kartoffeln von der Flüssigkeit völlig bedeckt waren. Zu jedem Versuch lief eine entsprechende Wasserkontrolle mit. Nach Ablauf der Einwirkungszeit schnitten wir die Wurzeln tragenden kurzen Keime mit einem Stück des darunterliegenden Gewebes heraus und legten sie in Petrischalen auf einer doppelten Lage des mit Aqua dest. angefeuchteten Fließpapiers aus. Abweichend vom Kressetest wurden die zu prüfenden Verbindungen also nicht dem Fließpapier zugesetzt, wo sie während der ganzen Zeit des Wachstums einwirken konnten, sondern sie wurden vorher durch Tauchen appliziert. In jede Schale kamen so viel Keime, daß auf jeden Einzelversuch mindestens zehn 1 bis 3 cm lange Wurzeln entfielen. Die Länge einer jeden Wurzel wurde

zu Versuchsbeginn mit Hilfe eines Stechzirkels auf Millimeter genau bestimmt. Nach 17stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 27 °C wurden die Wurzeln erneut gemessen. Der durchschnittliche Längenzuwachs, ausgedrückt in Prozent der Kontrolle, diente dann als Maß für die Wachstumsbeeinflussung.

In Tabelle 1 sind die mit beiden Substanzen erhaltenen Ergebnisse für die 2- und 4stündige Tauchzeit wiedergegeben. Auch hier nimmt die Wachstumshemmung mit steigender Konzentration zu, wobei der Wirkungsunterschied zwischen IPC und ÄPC größer ist als im Kressetest. Die Verdoppelung der Tauchzeit hatte dagegen nicht ganz die erwartete Wirkung. Zwar sind die Zuwachswerte nach der 4stündigen Behandlung stets kleiner als nach 2stündiger Einwirkung, doch ist die Differenz zwischen den einander entsprechenden Werten in den meisten Fällen gering. Rechnet man die Konzentrationsangaben in mol/Liter um und überträgt die erhaltenen Werte in ein Wahrscheinlichkeitsnetz (Abb. 2), so verschieben sich die Verhältnisse weiter zugunsten des IPC.

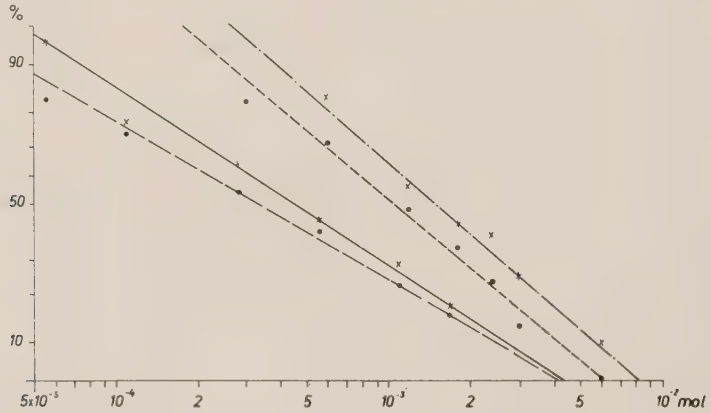


Abb. 2. Darstellung der Wirkung von IPC und ÄPC auf das Wachstum von Kartoffelwurzeln im Wahrscheinlichkeitsnetz. Abszisse: Konzentration in mol/Liter; Ordinate: Längenzuwachs in Prozent der Kontrolle. Die Kreuze markieren die Werte nach 2-, die Punkte nach 4stündiger Einwirkung.

——— IPC 2 h, — — — IPC 4 h, —·—·— ÄPC 2 h, – – – – – ÄPC 4 h

Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Kressetestes zeigt, daß die Wirkungsunterschiede zwischen IPC und ÄPC bei den Kartoffelwurzeln erheblich größer sind als bei der Kresse. Dabei haben die IPC-Kurven für die Kartoffel- und Kressewurzeln einen ähnlichen Verlauf, wie die benachbarte Lage der ED 50-Werte und die Neigungswinkel der Kurven zeigen (Tab. 2). Im Gegensatz hierzu weicht das Verhalten des ÄPC insofern ab, als bei der Kartoffel nicht nur die erforderlichen Hemmungskonzentrationen erheblich größer sind, sondern der steilere Anstieg auch einen ganz anderen Kurvenverlauf bedingt. Ob die etwa 8 bis 10 ° betragende Differenz der Neigungswinkel zwischen den IPC- und ÄPC-Kurven zur Annahme zweier verschiedener Wirkungsmechanismen berechtigt, wie dies oben gefordert wurde, ist um so schwieriger zu entscheiden, als auch die beiden IPC-Kurven für die

Tabelle 1

Wachstum von Kartoffelwurzeln nach 2- und 4stündiger Behandlung mit IPC und ÄPC, ausgedrückt in Prozent der unbehandelten Kontrolle

Konz. %	Längenzuwachs nach 17 Stunden			
	ÄPC		IPC	
	2 h	4 h	2 h	4 h
0,1	9,4	5,4	—	—
0,05	23,5	11,6	—	—
0,04	36,7	21,4	—	—
0,03	40,8	33,6	16,1	14,4
0,02	54,6	46,4	27,5	21,5
0,01	83,2	70,0	42,8	39,4
0,005	109,1	81,8	63,7	53,1
0,002	—	—	77,0	73,5
0,001	—	—	92,9	83,0
0,0005	—	—	102,5	104,8

2- und 4stündige Tauchzeit nicht ganz parallel laufen. Allerdings beträgt hier die Differenz der Anstiegswinkel nur 2 ° und liegt damit sicherlich noch im Bereich des methodischen Fehlers. Dieser muß im vorliegenden Falle von vornherein viel größer angenommen werden als beim Kressetest, bei dem mit einheitlichem Material und unter weitgehend konstanten Versuchsbedingungen gearbeitet wird, was bei den Versuchen mit Kartoffelwurzeln nicht im gleichen Maße möglich ist.

Da nun die enge chemische Verwandtschaft beider Verbindungen und die fast völlige Parallelität ihres bisherigen Verhaltens (Nultsch 1958, 1959 c) die Annahme einer unterschiedlichen Wirkungsmechanik in diesem einen Falle wenig verlockend erscheinen läßt, bleibt nur der Ausweg, die Ursache dieses abweichenden Verhaltens nicht in einem verschiedenen biochemischen Wirkungsmechanismus, sondern in einem abweichenden physikalischen Absorptionsmechanismus zu suchen. Die Möglichkeit hierzu ist insofern gegeben, als beide Verbindungen sich [illegible] in ihren physikalischen Eigenschaften, z. B. Dampfdruck, Wass[illegible]Lipoidlöslichkeit[1]) unterscheiden, was unter verschiedenartigen Versu[illegible]ngen sicherlich auch Unterschiede in ihrem physiologischen Wirkun[illegible]r Folge hat. Der mögliche Einwand, daß solche Unterschiede s[illegible]n anderen Versuchen, wie etwa im Kressetest, hätten zeigen müss[illegible]t zwingend, da hier die Applikationsweise eine ganz andere ist. [illegible]s z. B. denkbar, daß das ÄPC aus dem nach Beendigung des Tauc[illegible]ckbleibenden, die Wurzel allseitig

[1]) Nach unseren allerdings nur ungefähren Ermittlungen beträgt der Teilungskoeffizient (Overton 1901) $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ bei ÄP[illegible]42 und bei IPC $\frac{2{,}5}{0{,}036} = 70$, liegt also für IPC günstiger. Der Dampfdruck, der nur vermittels der Verdampfungsgeschwindigkeit annäherungsweise verglichen werden konnt[illegible] ist bei ÄPC größer als bei IPC.

umgebenden Wasserfilm infolge seines erheblichen Dampfdruckes verhältnismäßig rasch entweicht, während das IPC langsamer verdampft und nachträglich von der Wurzel noch in stärkerem Maße adsorbiert wird. Beim Kressetest dagegen sind weit größere Mengen beider Verbindungen in den Keimschalen vorhanden, weshalb hier der Dampfdruck an Bedeutung zurücktritt. Wieweit die relativ bessere Lipoidlöslichkeit des IPC dabei eine Rolle spielt, ist schwer zu entscheiden, doch muß jedenfalls auch sie in Rechnung gestellt werden.

Trotz der verschiedenen Neigungswinkel der Kurven oder richtiger wohl gerade deshalb ist es von Interesse, die entsprechenden ED 50-Werte miteinander zu vergleichen. Setzen wir die ED 50-Werte der beiden IPC-Kurven gleich 100 und beziehen hierauf die entsprechenden ÄPC-Werte (Tab. 2), so zeigen die Vergleichszahlen von 337 und 323 %, daß zur Erzielung des gleichen Effektes von ÄPC mehr als das Dreifache der benötigten IPC-Menge erforderlich ist. Stellt man den Vergleich an einer anderen Stelle der Kurven an, etwa bei 95 %, so ergibt sich infolge des verschiedenen Anstiegswinkels sogar eine 5- bis 7mal größere Wirkung des IPC, was seiner zehnfach größeren Wirksamkeit im Keimhemmungsversuch (NULTSCH 1958) schon recht nahe kommt. Danach entfaltet das IPC also in niedrigen Konzentrationen eine erheblich stärkere Wirkung als das ÄPC, was sich wiederum aus seiner geringeren Flüchtigkeit erklären läßt. Dieser Faktor könnte auch für die Keimhemmungsversuche von Bedeutung sein, und es will scheinen, daß das IPC, das nur eine etwas stärkere physiologische Wirksamkeit besitzt als das ÄPC, dessen Wirkung unter den Bedingungen des Keimhemmungsversuches eben wegen dieser anderen physikalischen Eigenschaften um das zehnfache übertrifft.

Tabelle 2

Vergleich der Wirkung von IPC und ÄPC gemäß Abbildung 2

Substanz	Tauchzeit	ED 50	in %	Neigungswinkel
IPC	2 h	$4{,}30 \cdot 10^{-4}$	100	33,0°
ÄPC	2 h	$1{,}45 \cdot 10^{-3}$	377	41,5°
IPC	4 h	$3{,}10 \cdot 10^{-4}$	100	31,0°
ÄPC	4 h	$1{,}00 \cdot 10^{-3}$	323	40,5°

In diesem Zusammenhange interessiert noch die Frage, ob die Zone der Zellvermehrung und die Zone des Streckungswachstums in gleichem Maße durch IPC beeinträchtigt werden, oder ob die bei der Zellteilung und beim Streckungswachstum ablaufenden physiologischen Prozesse dieser Verbindung gegenüber verschieden empfindlich sind. Zur Klärung dieser Frage führten wir Wachstumsmessungen an markierten Kartoffelwurzeln durch.

Als Versuchsmaterial dienten wiederum in Sägemehl vorgekeimte Kartoffeln, die je 2 Stunden in die Versuchslösungen (0,002, 0,005 und 0,01 % IPC) eingelegt wurden. Von diesen lösten wir die kürzeren Keime, deren Wurzeln eine Länge von etwa 10 mm hatten, vorsichtig ab und befestigten

sie mit einer Nadel an dem Korkdeckel der als feuchte Kammer dienenden planparallelen Küvette. Die Markierung der Wurzelspitzen geschah in der bekannten Weise durch Auftragen kleiner Tröpfchen einer Verreibung feiner Tierkohle in Paraffinum liquidum mit einer Borste unter der binokularen Lupe. Die Abstände der Punkte, die bei einiger Übung keine allzugroßen Schwankungen aufweisen und in unseren Versuchen zwischen 0,5 und 0,7 mm lagen, wurden zu Versuchsbeginn im Horizontalmikroskop mit einem Meßokular bestimmt. Nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 25 °C wurden sie erneut gemessen und aus der Differenz der Meßwerte der Zuwachs der einzelnen Abschnitte berechnet. Um die Meßergebnisse der zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Versuche untereinander vergleichbar zu machen, rechneten wir die Einzelwerte in Prozent des Zuwachses der jeweils mitlaufenden Wasserkontrolle im gleichen Abschnitt um. Die Durchschnittswerte aus je 10 Einzelmessungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Nach Einwirkung von 0,002 % IPC ist noch keine deutliche Tendenz festzustellen, was allerdings bei der geringen Gesamthemmung dieser Konzentration verständlich erscheint. In den höheren Konzentrationen ist dagegen die Spitzenregion (Abschnitt 0—1) deutlich stärker betroffen als die übrigen Abschnitte, und auch bei diesen nimmt die Beeinträchtigung mit zunehmender Entfernung von der Spitze ab. Die durch IPC verursachte Wachstumshemmung ist also um so geringer, je älter die Zellen des jeweiligen Abschnittes sind, je mehr es sich also um ein Streckungs- und Differenzierungswachstum handelt.

Tabelle 3

Vergleich der Wachstumshemmung in den einzelnen Wachstumszonen der Kartoffelwurzel nach 2stündiger Einwirkung verschiedener IPC-Lösungen

Durchschnittlicher Zuwachs in μ und in Prozent der Kontrolle

Abschnitt	Kontr.	0,002		0,005		0,01	
	μ	μ	%	μ	%	μ	%
0—1	138	137	99	77	56	0	0
1—2	366	305	83	241	66	120	33
2—3	407	426	105	263	64	132	32
3—4	117	129	110	96	82	47	40
4—5	71	60	85	65	92	43	61

Obwohl diese Versuche kursorischen Charakter haben und somit nur bedingte Beweiskraft besitzen, lassen sie doch deutlich erkennen, daß der primäre Angriffspunkt der Carbamate die äußerste Wurzelspitze, d. h. die Zone der Zellteilungen ist. Das Streckungswachstum wird wesentlich schwächer gehemmt, und die Beeinflussung der an die Hauptwachstumszone anschließenden Abschnitte, deren Zuwachs ohnehin gering ist, setzt erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen ein. Die bei der Zellteilung ablaufenden Prozesse sind also gegen IPC empfindlicher als die Zellstreckungs- und Differenzierungsvorgänge, eine Feststellung, die in anderen Beobachtungen noch eine Bestätigung finden wird.

2. Einfluß von Wirkstoffkonzentrationen und Behandlungsdauer auf die Keimfähigkeit und das Sproßwachstum der Kartoffeln

Sowohl auf Grund ihres anatomischen Aufbaus als auch wegen ihres wesentlich langsameren Wachstums sind die Sprosse der Kartoffelpflanzen für exakte Wachstumsmessungen, wie sie an Wurzeln durchgeführt werden können, wenig geeignet. Zur Untersuchung des IPC-Einflusses auf das Austreiben und die Entwicklung der Sprosse bedienten wir uns daher der Gewächshausversuche. Neben der größeren Ungenauigkeit haben diese zwar noch den Nachteil eines beträchtlichen Aufwandes und einer längeren Versuchsdauer, tragen dafür aber bis zu einem gewissen Grade den Bedingungen der Praxis Rechnung.

In der ersten Januarwoche 1958 wurde eine Versuchsreihe angesetzt, die sich im Prinzip an die Versuchsanordnung der Keimhemmungsversuche (NULTSCH 1958) anlehnte. Je 5 kg Kartoffeln der Sorte „Aquila" wurden in Glasglocken gegeben und mit je 10 g der Prüfungsmuster behandelt, die neben Talkum als Trägerstoff folgende Wirkstoffmengen enthielten:

IPC 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 %.

ÄPC 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 %.

Außerdem lief eine unbehandelte Kontrolle mit.

In Abständen von 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen sowie 3, 4, und 6 Monaten wurden allen Ansätzen je 500 g Kartoffeln entnommen, sorgfältig gewaschen und nach 24stündigem Trocknen an der Luft in geeigneten Töpfen (20 × 20 × 25 cm) mit feuchter Erde ausgelegt. Um die jahreszeitlichen Schwankungen möglichst auszuschalten, stellten wir die Töpfe im Gewächshause bei 20 °C und 70 bis 80 % relativer Luftfeuchtigkeit auf. In den Wintermonaten war eine Zusatzbeleuchtung erforderlich, die aus blau-rotem Mischlicht der Leuchtröhren HNT und HNJ (40 W) der Firma BGW bestand. Trotz dieser Maßnahme

Abb. 3. Gewächshausversuch mit ÄPC-behandelten Kartoffeln. Behandlungsdauer 1 Woche. In a 14 Tage, in b 6 Wochen nach dem Auspflanzen

Abb. 4. Gewächshausversuch mit IPC-behandelten Kartoffeln, 6 Wochen nach dem Auspflanzen. Behandlungsdauer 4 Wochen

betrugen die Schwankungen im Ertragsgewicht der Kontrollen in einigen Fällen mehr als 25 %, wobei die Sproßgewichte in den Wintermonaten durchweg erheblich größer waren. In Prozent der jeweiligen Kontrolle umgerechnet sind die Ergebnisse der einzelnen Ansätze jedoch untereinander vergleichbar. Nach 6 Wochen brachen wir die Versuche ab und ermittelten das Gesamtgewicht sowie die Anzahl der Sprosse je Behandlung. Die Knollen fanden zu weiteren Versuchen Verwendung (vgl. Kap. II, 1).

Bonitiert man in diesen Versuchen zur gegebenen Zeit, d. h. nach etwa 14 Tagen, den Auflauf, so kann man schon bei den kürzesten der gewählten Behandlungszeiten eine Verzögerung des Auflaufens der mit höheren Konzentrationen von IPC und APC behandelten Kartoffeln beobachten (Abb. 3a). Die wachstumshemmende Wirkung dieser beiden Verbindungen kommt also schon nach so kurzfristiger Behandlung deutlich zum Ausdruck. Zwar gleichen sich diese Unterschiede, wie Abbildung 3 b zeigt, im Verlaufe des weiteren Wachstums wieder aus, doch wird die Auflaufverzögerung mit zunehmender Behandlungsdauer und steigender Konzentration immer ausgeprägter. Gleichzeitig nimmt die Zahl der auflaufenden Sprosse zu-

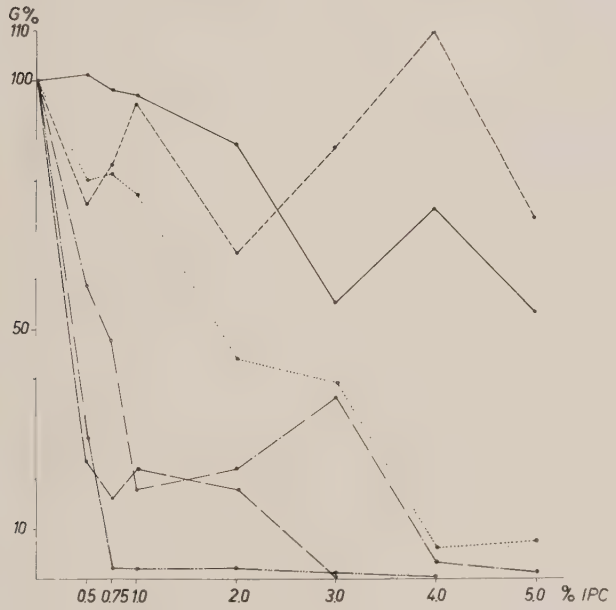


Abb. 5. Ergebnisse der Sproßgewichtsbestimmungen des IPC-Versuches. Abszisse: Konzentration; Ordinate: Sproßgewicht in Prozent der Kontrolle. Behandlungszeiten: – – – – – 1, ——— 2, · · · · · 4, —·—·— 6 Wochen; — — — 2, —···—···— 3, –·–·– 4, —x—x— 6 Monate Bei 4- und 6monatiger Behandlung waren alle Kartoffeln ungekeimt

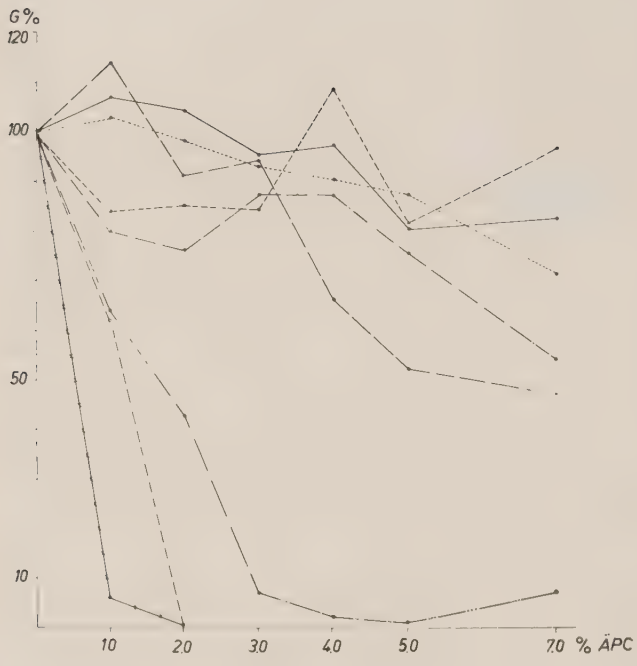


Abb. 6. Ergebnisse der Sproßgewichtsbestimmungen des ÄPC-Versuches. Erklärungen vgl. Abb. 5

sehends ab (Abb. 4), bis schließlich die Keimung ganz unterbleibt.

Die Ergebnisse der Sproßgewichtsbestimmungen sind in den Abbildungen 5 und 6 graphisch dargestellt. Die Sproßgewichte sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle umgerechnet. Das durchschnittliche Sproßgewicht der Kontrollen lag bei 350 g je Ansatz, schwankte jedoch zwischen 492 und 274 g. Solche Schwankungen, die auch bei den behandelten Ansätzen größere Sprünge im Kurvenverlauf hervorrufen, haben ihre Ursache wohl in erster Linie in dem geringen Umfang der Einzelversuche. Da wir diesen aber bei der ohnehin recht großen Zahl von Varianten begreiflicherweise nicht beliebig erweitern konnten, mußten die Schwankungen in Kauf genommen werden. Für das Gesamtergebnis sind sie insofern belanglos, als nicht so sehr die Ergebnisse einzelner Ansätze, sondern vielmehr die Gewichtsveränderungen innerhalb der Konzentrationsreihen in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung interessierten, deren Tendenz in allen Fällen klar zutage tritt.

Während die Schwankungen in den Sproßgewichten nach 7tägiger Einwirkung des IPC wohl noch durch die Fehlerhaftigkeit der Methode bedingt sind, ist die Gewichtsabnahme nach 14tägiger Behandlung bei den höheren Konzentrationen bereits signifikant. Nach 4- und 6wöchiger Einwirkung von 4 und 5 % IPC ist das Sproßgewicht auf ganz geringe Werte abgesunken und zeigt auch bei den schwächeren Konzentrationen eine mehr oder weniger starke Verminderung. Die Fortsetzung der Behandlung führt bei 3 bis 5 % IPC nach zwei und bei 0,5 bis 2 % IPC nach vier Monaten zur völligen und irreversiblen Unterdrückung der Keimung. Auch die kürzer befristeten Einwirkungszeiten haben eine deutliche und meist sogar erhebliche Verringerung des Sproßgewichtes zur Folge.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei ÄPC, nur sind hier, wie zu erwarten, die zur völligen Unterdrückung der Keimung erforderlichen Konzentrationen bzw. Einwirkungszeiten wesentlich höher. So ist eine eindeutige Abnahme des Sproßgewichtes in den höchsten Konzentrationen erst nach 4wöchiger

Einwirkung erkennbar und selbst hier noch nicht einmal so ausgeprägt wie bei den entsprechenden IPC-Konzentrationen nach 14 Tagen. In 1 %iger Einstellung vermag das ÄPC auch nach 6monatiger Einwirkung die Keimung nicht völlig zu unterbinden, und die 2- bis 7%ig eingestellten Mittel benötigen hierzu 4 Monate. Der zeitliche Verlauf der Gewichtsabnahme bei 7 % ÄPC entspricht etwa dem von 0,75 bis 1,0 % IPC, worin wieder die etwa 10mal stärkere Wirkung des IPC zum Ausdruck kommt.

Anders verhalten sich die Sproßzahlen. Sie sind in Tabelle 4 für die Kontrolle absolut, für die behandelten Ansätze in Prozent der Kontrolle angegeben. Am interessantesten sind die Ergebnisse nach ÄPC-Einwirkung. Während sich bei diesem die Sproßzahlen nach 1- und 2wöchiger Behandlung von denen der Kontrolle nur wenig unterscheiden, nehmen sie von der vierten Woche der Behandlung an bei allen Konzentrationen deutlich zu, um nach 6 bis 8 Wochen ein Maximum zu erreichen. Hier ist die Anzahl der Sprosse in einigen Fällen, z. B. bei 2 und 3 % ÄPC, mehr als doppelt so groß wie in der Kontrolle, obwohl das Gesamtsproßgewicht zur gleichen Zeit schon im Abnehmen begriffen ist (Abb. 7). Wird die Behandlung über diesen Zeitpunkt hinaus fortgesetzt, nehmen die Sproßzahlen rasch ab. Da sie den Nullwert naturgemäß gleichzeitig mit dem Sproßgewicht, also nach 4 Monaten, erreichen, ist der Sprung bisweilen sehr groß, z. B. bei 3 % ÄPC von 229 % nach 2 Monaten, auf 16 % nach 3 Monaten. Bis zu einem gewissen Grade stimmen diese Ergebnisse mit den Feststellungen von Quantz (1949) überein.

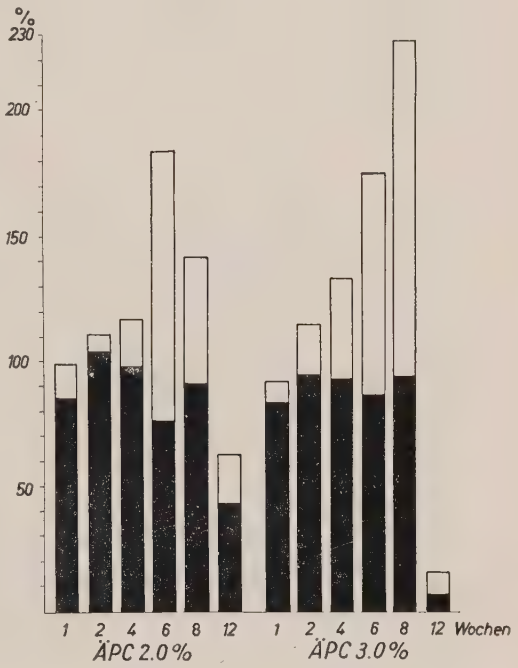


Abb. 7. Verhältnis von Sproßgewicht (schwarz) und Sproßanzahl (weiß), jeweils in Prozent der Kontrolle ausgedrückt. Das Pflanzgut war 1 bis 12 Wochen mit 2 und 3 % ÄPC behandelt

Auch nach IPC-Einwirkung steigt die Sproßzahl bei den niedrigen Konzentrationen in einigen Fällen über den Kontrollwert an. Allerdings ist dieser Anstieg keineswegs so ausgeprägt wie bei ÄPC und erreicht im Maximum (0,5 %, 6 Wochen) nur 152 %. In allen Konzentrationen oberhalb 1 % sinkt die Sproßzahl, dem Keimgewicht folgend, mehr oder weniger rasch ab.

Es ist nun leicht einzusehen, daß die Zunahme der Sproßzahl bei gleichbleibendem oder gar abnehmendem Gesamtgewicht auf Kosten des Gewichtes der Einzelsprosse gehen muß. In der Tat sind diese Sprosse viel dünner und

Tabelle 4

Aufstellung der aus je 500 g Kartoffeln in 6wöchiger Versuchsdauer erhaltenen Sproßzahlen
Erklärungen im Text

Mittel	Konz. %	Behandlungsdauer in Wochen				Behandlungsdauer in Monaten			
		1	2	4	6	2	3	4	6
Kontrolle	—	31	39	30	25	31	32	39	51
IPC	0,5	116	95	107	152	52	34	0	0
IPC	0,75	120	110	114	92	26	13	0	0
IPC	1,0	96	103	100	48	16	22	0	0
IPC	2,0	76	102	48	32	13	6	0	0
IPC	3,0	104	83	66	64	0	6	0	0
IPC	4,0	121	93	23	8	0	0	0	0
IPC	5,0	93	73	17	16	0	0	0	0
ÄPC	1,0	104	115	144	196	174	88	28	< 1
ÄPC	2.0	99	111	117	184	142	63	0	0
ÄPC	3,0	92	115	134	176	229	16	0	0
ÄPC	4,0	94	97	131	232	139	3	0	0
ÄPC	5,0	100	99	148	172	168	3	0	0
ÄPC	7,0	100	104	105	184	84	19	0	0

hinfälliger, während in der Länge kaum Unterschiede bestehen. Die Erhöhung der Sproßzahl kann daher auch bei Saatkartoffeln nicht unbedingt als Vorteil angesehen werden.

3. Freilandversuche

Wie bereits erwähnt, brachen wir die Gewächshausversuche nach 6 Wochen ab, da die geringe Größe der Versuchsgefäße und der hierdurch bedingte enge Pflanzenabstand ihre Fortsetzung wenig sinnvoll erscheinen ließ. Da sich aber anfängliche Unterschiede im Auflauf und in der Entwicklung im Verlaufe der Vegetationsperiode weitgehend wieder ausgleichen können und dann auf den Ertrag ohne Einfluß bleiben, wiederholten wir diese Versuche auf einer Freilandfläche (Versuchsgarten).

Um die Aussaat der Kartoffeln an einem Tage vornehmen zu können, behandelten wir das Pflanzgut in entsprechenden Abständen vor dem Pflanztermin. Die Behandlungstermine wählten wir so, daß sich am 29. 4. 58, dem Tage der Versuchsanlage, sieben Behandlungszeiten ergaben: 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen. Die Versuchspräparate enthielten folgende Wirkstoffmengen: IPC 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 %. ÄPC 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 %. Als Trägerstoff fand wieder Talkum Verwendung. Die Aufwandmenge betrug 200 g/100 kg. Sowohl die Einwirkungszeiten als auch die Konzentrationen waren also den Gewächshausversuchen gegenüber etwas verändert. Je Konzentration und Einwirkungszeit kam 1 kg Kartoffeln zur Anwendung, d. h.

jeweils 20 Stück. Einen Tag vor der Versuchsanlage wurden die Kartoffeln sorgfältig gewaschen und 24 Stunden an der Luft getrocknet.

Bei der Bonitierung der Versuche war wiederum eine starke Verzögerung des Auflaufens der mit IPC und ÄPC behandelten Kartoffeln festzustellen, die um so stärker hervortrat, je länger die Behandlungszeiten und je höher die Konzentrationen waren. Schon bei den niedrigsten Konzentrationen und kürzesten Behandlungszeiten verzögerte sich das Auflaufen um eine Woche und mehr, bei den höchsten Konzentrationen und langen Behandlungszeiten sogar um mehrere Monate, sofern die Keimung nicht völlig unterdrückt wurde.

Einen ungefähren Eindruck vom Auflauf und Wachstum der behandelten Kartoffeln vermitteln die Abbildungen 8 a und b, in denen der Stand der Freilandversuche etwa 2 Monate nach der Aussaat festgehalten ist.

Abb. 8. Freilandversuche 2 Monate nach der Aussaat. In a mit IPC, in b mit ÄPC behandelt. Konzentration der Mittel in den Längsreihen von hinten nach vorn, Behandlungsdauer in den Querreihen von rechts nach links in der angegebenen Reihenfolge zunehmend. Weitere Erklärungen im Text

Die Kontrolle in der hintersten Querreihe des IPC-Versuches (vor dem Mohnfeld) ist an ihrem höheren Wuchs deutlich zu erkennen. Sie überragt auch die davor liegende, fast lückenlos aufgelaufene Reihe der mit 0,1 % IPC behandelten Kartoffeln, was beweist, daß auch sehr geringe Konzentrationen dieser Verbindung das Wachstum der Kartoffelpflanzen deutlich beeinflussen, obwohl der prozentuale Auflauf kaum beeinträchtigt wird. In der Querreihe mit 0,5 % IPC treten bereits stärkere Unregelmäßigkeiten in Auflauf und

Wachstum auf, die bei weiterer Zunahme von Konzentration und Behandlungsdauer immer stärker werden. Die große Fehlstelle im Vordergrund links wird durch die Parzellen der 8, 10 und 12 Wochen lang mit 2 und 3 % IPC behandelten Kartoffeln gebildet. Aber auch in der rechten Hälfte, also in den Parzellen mit den kürzeren Behandlungszeiten, sind bei diesen Konzentrationen nur verhältnismäßig wenige Pflanzen zu zählen, die noch dazu in der Entwicklung weit zurückliegen.

Entsprechendes gilt für den ÄPC-Versuch (Abb. 8 b), in dem allerdings die Auflauf- und Wachstumsschäden deutlich geringer sind als beim IPC. Zum Zeitpunkt der Aufnahme sind in allen, auch in den mit höchsten Konzentrationen behandelten Parzellen wenigstens einige Pflanzen aufgelaufen, und auch ihre Entwicklung ist, wie ein Vergleich der beiden Abbildungen zeigt, allgemein weiter fortgeschritten als im IPC-Versuch.

Es ist natürlich, daß derart verspätet aufgelaufene Pflanzen keinen nennenswerten Ertrag mehr bringen können, um so mehr, als außer dem Auflauf eben auch die gesamte weitere Entwicklung der Kartoffelstauden durch die Behandlung mit den Carbamaten gehemmt wird. Es war daher zu erwarten, daß sich die Dauer der Behandlung und die Konzentration des Mittels im Ertrag widerspiegeln würden. Die am 9. 9. 58 durchgeführten Ertragsbestimmungen, in denen das Knollengewicht je Parzelle ermittelt wurde, bestätigten dies. Die Erntegewichte sind in Tabelle 5 aufgeführt, und zwar für die Kontrollen in kg, für die behandelten Parzellen in Prozent der jeweiligen Kontrolle. Die Ertragsgewichte der Kontrollparzellen lagen zwischen 16,3 und 19,2 kg, im Durchschnitt bei 17,7 kg.

Tabelle 5

Ergebnisse des Freilandversuches 1958

Erklärungen im Text

Mittel	Konz. %	Behandlungsdauer (Wochen)						
		1	2	4	6	8	10	12
Kontrolle	—	17,8	18,1	18,1	17,6	19,2	16,3	17,2
IPC	0,1	97	87	74	83	93	70	56
IPC	0,5	85	70	48	26	65	33	10
IPC	1,0	69	49	25	14	7	11	0
IPC	2,0	71	52	24	3	1	8	0
IPC	3,0	56	23	40	2	0	1	0
ÄPC	1,0	87	94	89	60	92	53	38
ÄPC	2,0	74	82	82	58	68	35	25
ÄPC	3,0	86	68	67	50	49	25	21
ÄPC	4,0	97	75	61	37	46	19	1
ÄPC	5,0	66	58	44	38	34	14	7
ÄPC	7,0	67	76	47	27	26	12	3

Im Freiland machen sich auch kurzfristige Behandlungen von 1 bis 2 Wochen Dauer wesentlich stärker bemerkbar als im Gewächshausversuch,

und zwar sowohl bei IPC als auch bei ÄPC. Das ist insofern verständlich, als sich eine Auflaufverzögerung unter den wechselhaften Witterungsbedingungen des Freilandes meist nachteiliger auswirkt als im Gewächshause, wo die für das Wachstum gleichmäßig günstigen Verhältnisse einen relativ raschen Ausgleich kleinerer Differenzen ermöglichen. Von diesen geringfügigen Unterschieden abgesehen stimmen die Ergebnisse der Freilandversuche mit denen der Gewächshausversuche überraschend gut überein (Abb. 9). Grundsätzlich bestätigen die Freilandversuche die Ergebnisse der Gewächshausversuche und zeigen, daß die Carbamate auch bei kurzfristiger Einwirkung erhebliche Ertragsverminderungen verursachen können.

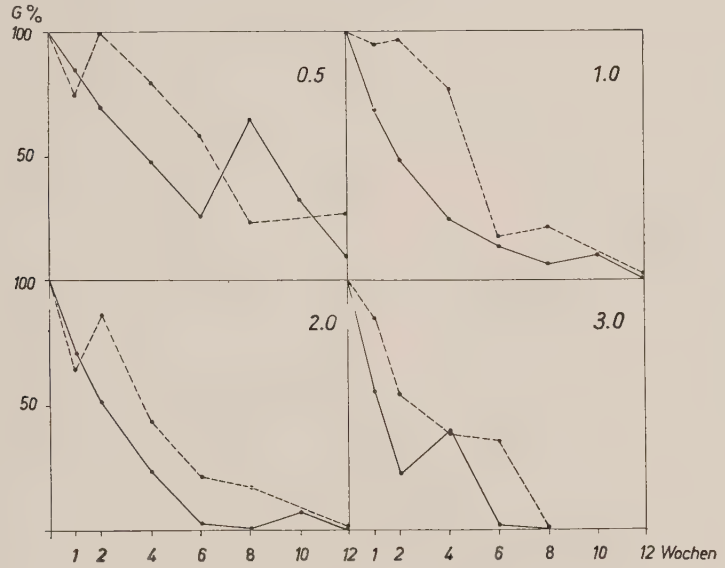


Abb. 9. Vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse der Gewächshaus- und Freilandversuche mit 0,5; 1,0; 2,0 und 3,0 IPC.
——— Freiland, – – – – – Gewächshaus

Die Keimfähigkeit und das Wachstum der Kartoffeln werden also durch beide Verbindungen bei steigender Konzentration und Behandlungsdauer in zunehmendem Maße in Mitleidenschaft gezogen, und zwar bei IPC stärker als bei ÄPC. Wenn auch die hier benutzte Sorte „Aquila" als diesen Verbindungen gegenüber besonders empfindlich gilt (Jacob 1952) und nach den Versuchen von Quantz (1949) u. a. die einzelnen Sorten auf die Behandlung mit carbamathaltigen Mitteln verschieden reagieren, so dürften doch diese Unterschiede nur gradueller, nicht aber prinzipieller Natur sein, da in höheren Konzentrationen schließlich alle Sorten Hemmungserscheinungen zeigen. Obwohl also die Möglichkeit, durch Herabsetzung der Konzentration oder Aufwandmenge oder durch Verkürzung der Behandlungsdauer die Schäden herabzusetzen, nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, ist die Anwendung carbamathaltiger Mittel im allgemeinen und des IPC im besonderen bei Saatkartoffeln gefährlich und kann zu schweren Schäden führen.

II. VERSUCHE ZUR FRAGE DER WIRKUNGSMECHANIK

1. Die toxische Wirkung der Carbamate auf die Augen und Keime der Kartoffeln

Nach den Ergebnissen der im vorigen Kapitel beschriebenen Versuche ist eine Wuchsstoffwirkung, die für andere Keimhemmungsmittel bekannt ist, im Falle der Carbamate insofern auszuschließen, als eine Stimulation des Wachstums durch unterschwellige Dosen bisher nicht beobachtet worden ist. Da auch, wie oben bereits näher ausgeführt, eine spezifische Hemmung von Atmungsfermenten nicht festgestellt werden konnte, lag es nahe, die Ursache der Wachstums- und Keimhemmung in der Zell- und Mitosegiftwirkung dieser Verbindungsklasse zu suchen.

Daß die beiden hier zur Debatte stehenden Verbindungen in höheren Konzentrationen für das Kartoffelgewebe ausgesprochen toxisch sind, haben frühere Versuche gezeigt (NULTSCH 1958). Offen ist jedoch noch die Frage, ob sich die vorwiegend in der Gasphase einwirkenden Carbamate während der monatelangen Lagerung im Gewebe der damit behandelten Keimanlagen in so starkem Maße anzureichern vermögen, daß sie deren Tod herbeiführen.

Wir gingen dieser Frage in einer Versuchsreihe nach, in der die aus den Gewächshausversuchen stammenden Kartoffeln als Versuchsmaterial dienten. Nach gründlicher Säuberung der Knollen wurden alle nicht ausgetriebenen Augen ausgestochen, nach Behandlungsart getrennt in Erlenmeyerkolben gegeben und mit 0,1 %iger Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) übergossen. Nach 24stündigem Stehen im verdunkelten Raum erfolgte die Auswertung. Hierzu wurde jede Keimanlage unter der binokularen Lupe freipräpariert und der Länge nach gespalten, so daß das Eintreten oder Ausbleiben und gegebenenfalls auch die Intensität der Rotfärbung leicht festgestellt werden konnte. Bisweilen war der Ausfall der Reaktion nicht eindeutig, da sich das Gewebe einzelner Augen uneinheitlich oder nur schwach anfärbte. Um der im Einzelfall schwierigen Entscheidung aus dem Wege zu gehen, werteten wir diese Reaktionen zunächst als fraglich und zählten sie am Schluß zu je 50 % den positiven und negativen Reaktionen zu. Da auch in den Kontrollen stets ein Teil der Augen aus anderen, nicht durch die Behandlung bedingten Anlässen negativ reagierte, bezogen wir den Prozentsatz der positiv reagierenden Augen, den wir als Vergleichswert benutzten, auf den entsprechenden Wert der Kontrolle, den wir gleich 100 setzten. Die so erhaltenen Prozentzahlen sind das Maß für die mit zunehmender Behandlungsdauer und Konzentration größer werdende Toxizität der Carbamate.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Jedem der hier aufgeführten Werte liegen nur etwa 100 ausgezählte Augen zugrunde, was die stärkere Streuung der Einzelwerte erklärt. Aber wie schon in den Gewächshausversuchen ist auch hier nicht das Ergebnis des Einzelversuches, sondern die mit zunehmender Konzentration und Behandlungsdauer zu beobachtende Tendenz der Absterbekurven ausschlaggebend, die vor allem in Abbildung 10 gut zum Ausdruck kommt.

Allgemein nimmt die Zahl der positiv reagierenden, also noch voll lebensfähigen Augen mit zunehmender Dauer der Behandlung ab, und zwar um so rascher, je höher die Konzentration des Mittels ist. Dabei ist die Toxizität des ÄPC wieder wesentlich geringer als die des IPC, was besonders in den niedrigen Konzentrationen auffällt.

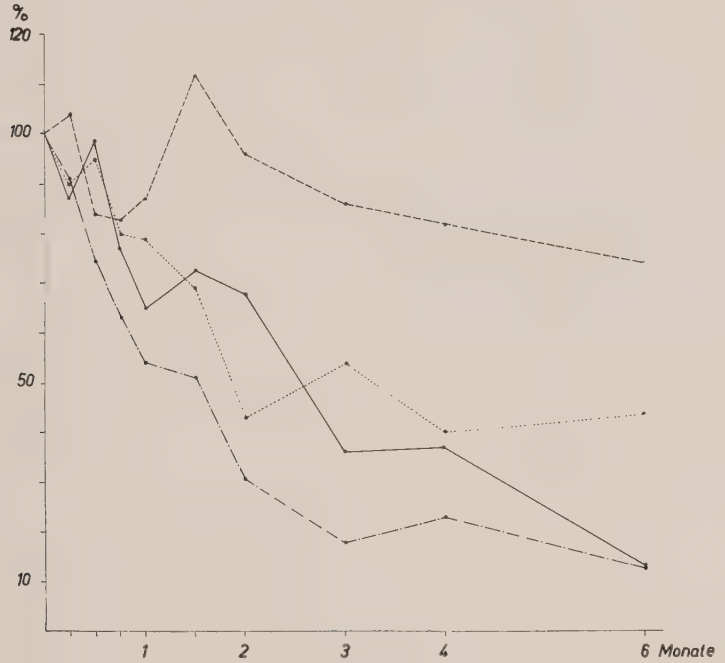


Abb. 10. Graphische Darstellung der Ergebnisse einiger TTC-Versuche. Abszisse: Behandlungsdauer in Monaten; Ordinate: Prozent der positiv reagierenden Keimanlagen. – – – – 1,0, ——— 7,0 % ÄPC; · · · · · 0,75, –·–·–·– 5,0 % IPC

So liegen die Schwankungen bei 1,0 % ÄPC, zum mindesten im ersten Teil der Kurve, noch deutlich im Bereich des methodischen Fehlers, während sich 0,75 % IPC bereits als stark toxisch erweist. Die Kurven für 0,75 % IPC und 7,0 % ÄPC zeigen einen ähnlichen Verlauf, in dem die etwa 10fach größere Wirkung des IPC eine erneute Bestätigung findet.

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit denen der Gewächshaus- und Freilandversuche, so ist die übereinstimmende Tendenz augenfällig. Je geringer der Austrieb der Keimanlagen mit zunehmender Behandlungsdauer wird, um so größer ist auch die Zahl der abgestorbenen und irreversibel geschädigten Augen. Allerdings ist diese Übereinstimmung keine vollständige, denn der prozentuale Anteil der noch lebensfähigen Augen ist stets deutlich größer als der prozentuale Austrieb. So verhindert beispielsweise das IPC in 5%iger Einstellung nach 6wöchiger Einwirkung das Austreiben der Kartoffeln völlig, obwohl erst etwa 50 % der Keimanlagen abgestorben sind. Entsprechendes gilt für die anderen Konzentrationen. Zwischen der zur Keimhemmung erforderlichen Konzentration bzw. Einwirkungszeit und den entsprechenden,

Tabelle 6

TTC-Reduktionsvermögen
der Keimanlagen behandelter und unbehandelter Kartoffeln

Die Zahlen in der Spalte „Kontrolle" geben den Prozentsatz der positiv reagierenden Augen, bezogen auf die Gesamtzahl, an, die übrigen Zahlen die gleichen Werte, umgerechnet in Prozent der Kontrolle

Substanz	Konz. %	Behandlungsdauer in Wochen				in Monaten			
		1	2	4	6	2	3	4	6
Kontrolle	—	87	75	81	59	75	83	65	88
IPC	0,5	99	79	79	64	48	75	58	50
IPC	0,75	90	95	79	69	43	54	40	44
IPC	1,0	91	76	74	79	30	43	29	51
IPC	2,0	83	98	75	85	58	48	41	26
IPC	3,0	87	86	60	71	22	34	28	21
IPC	4,0	91	97	80	51	25	30	22	13
IPC	5,0	91	75	54	51	31	18	23	12
ÄPC	1,0	104	84	87	112	96	86	82	74
ÄPC	2,0	102	75	87	78	86	78	47	38
ÄPC	3,0	97	86	89	94	69	56	30	39
ÄPC	4,0	96	92	65	77	56	67	27	44
ÄPC	5,0	85	91	76	66	72	52	28	36
ÄPC	7,0	87	99	65	73	68	36	37	12

zur prozentual gleichen Abtötung der Keimanlagen erforderlichen Daten liegt also stets eine größere Konzentrations- oder Zeitspanne, die beweist, daß die Abtötung der Keimanlagen nicht die Ursache, sondern ein Sekundäreffekt bei längerer Einwirkung der Carbamate ist.

Zu der gleichen Auffassung kommt man, wenn man die verschiedenen Phasen des Absterbevorgangs an den TTC-behandelten Augen verfolgt. Zunächst ist eine allmähliche Abnahme der Farbintensität zu beobachten, die über eine blaßrosa Tönung schließlich zum völligen Ausbleiben der Färbung führt. Diese farblosen Keime sind allerdings noch voll turgeszent, und erst bei fortgesetzter Einwirkung von IPC und ÄPC tritt nach Turgeszenzverlust eine bräunliche Verfärbung auf, die schließlich einer Schwarzfärbung und völligen Zerstörung des Keimgewebes Platz macht. Nach diesen Beobachtungen ergibt sich nachstehende Reihenfolge: Unterdrückung des Austreibens — Dehydraseninaktivierung — Turgeszenzverlust — Zelltod. Die Inaktivierung der Dehydrasen geht dem Turgeszenzverlust voraus und ist also nicht eine Folge des Zelltodes. Zugleich kann sie aber auch nicht die Ursache der Unterdrückung des Austreibens sein, da sie eine längere Einwirkungszeit bzw. eine höhere Konzentration der Mittel erfordert.

Behandelt man bereits gekeimte Kartoffeln mit carbamathaltigen Mitteln, so sterben die Keime nach kurzer Zeit ab (NULTSCH 1958). Auch hierin kommt die starke Toxizität dieser Verbindungen zum Ausdruck. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Beobachtung, die man häufig machen kann,

wenn man Kartoffeln mit unterschwelligen Dosen behandelt. Es wachsen dann die Keime in das Knollengewebe hinein, und mitunter kommt es sogar vor, daß sich an diesen Keimen innerhalb der alten Knolle eine neue bildet (Abb. 11).

Wachsen bei diesem Vorgang, der von WENZL (1954) als „Innenkeimung" bezeichnet wird, die Keime durch die ganze Kartoffel hindurch, so stirbt der nach außen durchbrechende Teil, wie Abbildung 11 zeigt, bereits nach kurzer Zeit ab, während der innerhalb der Knolle liegende Teil unverändert bleibt. Dies ist zugleich ein Beweis dafür, daß die Carbamate nicht in das Knolleninnere eingedrungen sind, sondern erst auf den Keim einwirken, wenn dieser die Oberfläche durchbrochen hat.

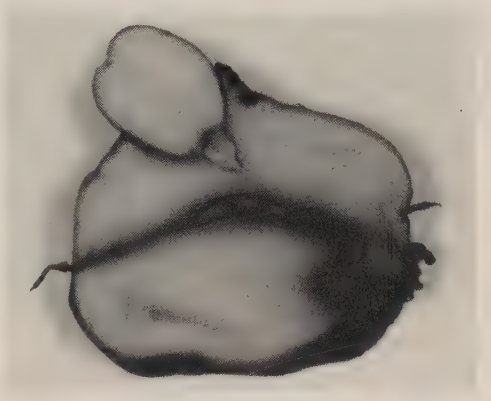


Abb. 11. Anomales Keimverhalten (Innenkeimung) einer Kartoffel nach mehrmonatiger Behandlung mit 3 % ÄPC. Der Keim ist von rechts nach links durchgewachsen. Der nach außen durchgebrochene Teil ist infolge ÄPC-Einwirkung abgestorben. Im oberen Teil der Abbildung ein anderer Keim mit Knollenbildung im Inneren der Mutterknolle

Nach diesen Versuchen steht es außer Zweifel, daß die Carbamate sich im Laufe der Zeit im Gewebe der damit behandelten Augen und Keime anreichern und dabei Konzentrationen erreichen, die den Zelltod zur Folge haben. Wenn auch das hierdurch verursachte Absterben der Keimanlagen als primäre Ursache der Keimhemmung nicht in Frage kommt, so sollte doch die starke Toxizität der untersuchten Verbindungen für die Praxis ein weiterer Grund sein, von einer Pflanzgutbehandlung mit diesen Mitteln auf jeden Fall Abstand zu nehmen.

2. Morphologische Veränderungen an Sprossen und Wurzeln nach IPC-Einwirkung

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt (LEVAN 1938), daß Colchicin und andere Mitosegifte des gleichen Typus (sogenannte C-Mitosegifte) an den damit behandelten Organen der Pflanzen keulige Anschwellungen kurz hinter den Vegetationspunkten, also in der Zone des Streckungswachstums, hervorrufen. LEVANS Vorschlag folgend werden sie allgemein als C-Tumoren bezeichnet. Sie kommen durch eine starke Volumenzunahme der einzelnen Zellen bei gleichbleibender Anzahl zustande. Nach den Feststellungen von ENNIS (1948) kann diese Zellvergrößerung mitunter von einer entsprechenden Vergrößerung der Kerne begleitet sein, doch sind exakte Beziehungen zwischen Zell- und Kerngröße bisher nicht ermittelt worden.

Auch nach IPC-Einwirkung ist die Ausbildung derartiger C-Tumoren bei verschiedenen Pflanzen beobachtet worden, und zwar vorwiegend bei Monokotylen, z. B. *Allium, Hordeum, Avena* u. a. (ENNIS 1948, DOXEY 1949,

Abb. 12. Keulige Anschwellungen von Kartoffelkeimen unterhalb der Vegetationspunkte nach 48stündiger IPC-Einwirkung. Im Bilde links drei unbehandelte Keime (etwa 2/3 nat. Größe)

DERENNE 1953). Nach DETTWEILERS (1952 b) Angaben fehlen sie bei Kartoffeln. In unseren Versuchen traten sie jedoch regelmäßig nach Einwirkung beider Carbamate an den Sprossen (Abb. 12) und Wurzeln (Abb. 13) der Kartoffeln auf, und zwar sowohl bei dauernder als auch bei nur vorübergehender Einwirkung. Allerdings erreichen sie hier nicht die Größe wie bei *Allium* nach Colchicineinwirkung, doch entsprechen sie, wie vergleichende Versuche mit 0,05 bis 0,1 % Colchicin zeigten, vollkommen den durch diese Substanz bei Kartoffeln hervorgerufenen morphologischen Veränderungen.

Ein weiteres, nach IPC-Einwirkung häufig zu beobachtendes Charakteristikum ist das Vorrücken der Wurzelhaarzone zur Wurzelspitze (Abb. 14), von der sie bei einer normalen Wurzel durch die mehrere Millimeter messende Zone des Streckungswachstums getrennt ist. Dabei ist der Besatz der Wurzeloberfläche mit Wurzelhaaren viel dichter als in der Kontrolle, wenn auch solche extremen Fälle, wie sie ENNIS (1948) für *Avena* beschreibt, von uns nicht beobachtet wurden. Die Wurzelspitzenbehaarung nach IPC-Einwirkung erklärt sich daraus, daß nach der Verlangsamung oder Einstellung des Wurzelwachstums die Differenzierung der Epidermiszellen zu Wurzelhaaren mit der ursprünglichen Geschwindigkeit fortschreitet. Die Differenzierungsvorgänge sind also, wie oben bereits erwähnt, weniger IPC-empfindlich als die Wachstumsvorgänge.

Abb. 13. Keulige Auftreibung einer Kartoffelwurzel nach 2stündiger Einwirkung von 0,01 % IPC, 24 Stunden nach Versuchsbeginn (Vergr. etwa 10mal)

Abb. 14. Kartoffelwurzel, behandelt wie in Abb. 14. Die Wurzelhaare sind bis zur Spitze vorgerückt (Vergr. etwa 10mal)

Zu der gleichen Ansicht kamen auch Ennis (1948) und Doxey (1949) auf Grund ihrer Beobachtungen an Hafer und Roggen, in deren Wurzeln sie nach IPC-Behandlung voll ausgebildete Gefäße dicht hinter der Wurzelspitze fanden, ein Befund, der nach unseren Feststellungen auch für die Kartoffelwurzeln zutrifft. Die durch IPC hervorgerufenen Wachstumshemmungen können also ihre Ursache nicht in einer allgemeinen Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels haben, da diese notwendigerweise auch den Fortgang der Differenzierungsvorgänge behindern müßte.

Die stärksten morphologischen Veränderungen an den Kartoffelwurzeln zeigen sich nach 2stündiger Tauchzeit im Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,02 % IPC. Die Einwirkung höherer Konzentrationen oder eine entsprechende Verlängerung der Behandlungsdauer verhindert sowohl die Entstehung der C-Tumoren als auch die Ausbildung von Wurzelhaaren. Wie die Bräunung derart behandelter Wurzelspitzen anzeigt, wirkt das IPC hier bereits cytotoxisch. Entsprechendes gilt für die Sprosse, die allerdings höhere Konzentrationen besser vertragen. Unterhalb 0,005 % sind an Wurzeln nur noch selten schwache, mit dem unbewaffneten Auge oft gar nicht mehr erkennbare Anschwellungen zu beobachten. Bei dauernder Einwirkung, d. h. beim Zusatz des IPC zu dem als Keimbett dienenden Sägemehl, treten diese Veränderungen schon im Konzentrationsbereich von 0,0005 bis 0,005 % ein. Die Wirkung des IPC ist also mehr als zehnmal so stark wie die des Colchicins (0,05 bis 0,1 %).

Die gleichen morphologischen Veränderungen finden sich auch nach der Einwirkung von ÄPC, nur sind hier, wie in allen anderen Versuchen, die zur Erzielung des gleichen Effektes erforderlichen Konzentrationen höher als beim IPC. Der Bereich der stärksten Veränderungen liegt bei 2stündiger Einwirkung zwischen 0,02 und 0,05 % ÄPC.

Die Feststellung der beschriebenen morphologischen Veränderungen, die allgemein als charakteristische Reaktionen pflanzlicher Organe auf die Einwirkung gewisser Mitosegifte bekannt sind, legte die Vermutung nahe, daß das IPC auch bei der Kartoffel den Ablauf der Mitose beeinflußt.

3. Cytologische Untersuchungen

Die Mitosegiftwirkung der Urethanabkömmlinge auf tierische und pflanzliche Zellen ist seit langem bekannt. So berichten Hüttig (1933), Küster (1946), Hohl (1947), Battaglia (1949), Oehlkers (1949) u. a. über die Beeinflussung mitotischer und meiotischer Teilungen durch Äthylcarbamat. Die Ähnlichkeit der cytologischen Effekte des ÄPC mit den durch Colchicin hervorgerufenen Veränderungen erkannte Lefèvre schon 1939, und Ennis (1948), Doxey (1949) und Derenne (1953) konnten die Mitosegiftwirkung des als Herbizid angewandten IPC bei verschiedenen, vorwiegend monokotylen Pflanzen *(Avena, Hordeum, Secale, Allium)* nachweisen. Allerdings zeigen die Versuche Derennes an *Vicia faba* wie auch einige gelegentliche Beobachtungen von Ennis an Tomaten, Kartoffeln und Buchweizen, daß die IPC-Wir-

kung nicht auf die Monokotylen beschränkt ist, wenn auch im Grad der Empfindlichkeit Unterschiede gegenüber den Dikotylen zu bestehen scheinen, deren innere Ursachen nicht bekannt sind. Unter diesen Umständen ist es kaum einzusehen, warum die cytologischen Wirkungen des IPC gerade für den Fall der Keimverzögerung bei Kartoffeln nur sekundäre Bedeutung besitzen sollen, wie DETTWEILER (1952 b) annimmt. Da außerdem die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen auf eine Mitosegiftwirkung schließen lassen, sahen wir uns zu einer genaueren Nachprüfung dieser Frage veranlaßt.

Als Material fanden in unseren Versuchen überwiegend Wurzeln, in einzelnen Fällen aber auch Sprosse in Sägemehl vorgekeimter Kartoffeln Verwendung. Hatten die Wurzeln eine Länge von etwa 1 cm erreicht, setzte die Behandlung ein, die in den einzelnen Versuchsreihen verschieden war:

Versuchsreihe 1: In dieser legten wir die gekeimten Kartoffeln in die Versuchslösungen (0,0005 bis 0,03 % IPC) ein, in denen sie die ganze Zeit über blieben. Nach 4, 8, 24 und 48 Stunden wurden jeweils einige Wurzeln abgeschnitten und fixiert.

Versuchsreihe 2: Es kamen die gleichen Konzentrationen zur Anwendung wie in der vorigen Versuchsreihe, doch beschränkten wir uns auf Tauchzeiten von 2 und 8 Stunden. Anschließend wurden die Keime ausgestochen und in feuchte Kammern gelegt. Die Fixierung erfolgte nach 1 bis 4 Tagen. Im Gegensatz zur Dauerbehandlung der ersten Versuchsgruppe wurde hier die befristete Behandlung durch eine Phase der Erholung abgelöst.

Versuchsreihe 3: Abweichend von den beiden ersten Versuchsgruppen wurden die Kartoffeln nicht getaucht, sondern nach Erreichen des gewünschten Entwicklungszustandes in frisches Sägemehl eingelegt, das mit Lösungen von 0,0005, 0,001, 0,005 und 0,01 % IPC angefeuchtet war und täglich damit gegossen wurde. Von Zeit zu Zeit entfernten wir einige Wurzeln und Sproßspitzen und fixierten sie. Die längste Einwirkungszeit betrug in diesen Versuchen 14 Tage. Zu den Versuchsreihen 2 und 3 führten wir Parallelversuche mit 0,05 bis 0,5 % Colchicin durch.

Die besten Ergebnisse erhielten wir mit der dritten Versuchsreihe, während die erste nicht befriedigte. Die Kartoffelwurzeln vertragen das längere Tauchen schlecht und reagieren sehr bald mit einer Einstellung des Wachstums. Auch macht sich die starke Cytotoxizität der Carbamate in den gewählten Konzentrationen bei längerer Einwirkungszeit störend bemerkbar. In den beiden anderen Versuchsreihen erhielten wir grundsätzlich die gleichen cytologischen Bilder, die deshalb gemeinsam behandelt werden können.

Zur Herstellung der mikroskopischen Präparate bedienten wir uns der Paraffinschnitte-Technik. Diese erfordert zwar einen größeren Aufwand als beispielsweise die HEITZsche Kochmethode, bietet dafür aber den Vorteil, daß der ursprüngliche Gewebeverband erhalten bleibt, was im vorliegenden Fall wünschenswert schien. Eine erhebliche Verkürzung des Einbettungsganges ließ sich durch die Verwendung von Tetrahydrofuran als Intermedium erreichen.

Hinsichtlich der Einzelheiten dieses Verfahrens sei auf NULTSCH (1954) verwiesen.

Als Fixierungsmittel fanden Chromessigsäure und das FLEMMINGsche Gemisch (stärkere Bonner Mischung nach SCHÖMMER 1949) Verwendung. Die mit dem letzteren erhaltenen mikroskopischen Bilder fielen befriedigender aus. Offenbar ist der Osmiumsäurezusatz im vorliegenden Falle von Vorteil. Von den eingebetteten Objekten wurden 10 μ dicke Längs- und Querschnitte angefertigt. Zur Färbung bedienten wir uns der FLEMMINGschen Dreifachfärbung (SCHÖMMER 1949), die wir hinsichtlich der Gentianaviolett-Färbung den Angaben von GEITLER (1949) gemäß modifizierten (Chromsäure-Beizung). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit der Ölimmersion Apo 90, 1,3 der Firma Zeiss, Jena.

Leider ist die Kartoffel für derartige cytologische Untersuchungen kein günstiges Objekt. Denn einerseits ergeben sich infolge der geringen Größe und der verhältnismäßig hohen Zahl der Chromosomen (2 n = 48) recht unübersichtliche Teilungsbilder, und andererseits reagiert die Kartoffel, wie die Parallelversuche mit Colchicin zeigten, auf die Einwirkung von Mitosegiften verhältnismäßig schwach, so daß die Häufigkeit der cytologischen Anomalien hier ungleich geringer ist als etwa bei *Allium cepa* und anderen cytologischen Standardobjekten. Am deutlichsten sind die Reaktionen bei der Wurzel in den äußersten Zellschichten, was übrigens von ENNIS (1948) auch für *Avena* angegeben wird.

Die auffälligste und bekannteste durch Colchicin und andere C-mitotische, d. h. colchicinähnliche Substanzen hervorgerufene cytologische Abnormität ist die teilweise oder völlige Unterdrückung der Kernspindel (LEVAN 1938). Sie äußert sich in der Bildung von multipolaren Spindeln, unvollständigen Mitosen, Aneuploidie und Polyploidie. Das Ergebnis multipolarer Kernteilungen sind mehrkernige Zellen, die zwei oder drei, in Extremfällen aber auch mehr Kerne haben. Ist die Trennung in der Anaphase unvollständig, bleiben die beiden Tochterkerne durch sogenannte Anaphasebrücken miteinander verbunden, oder es werden die beiden nicht völlig getrennten Chromosomenkomplexe sogar von einer gemeinsamen Kernmembran umgeben, was den Kernen ein hantelförmiges Aussehen verleiht (Pseudoamitosen). Schließlich kommt es auch vor, daß die beiden Tochterkomplexe sich gar nicht erst trennen und einen unregelmäßigen „Restitutionskern" mit doppelter Chromosomenzahl bilden. Neben diesen anomalen Aggregationen treten auch isolierte, sogenannte „versprengte" Chromosomen auf, die sich infolge von Defekten an einzelnen Spindelfasern aus dem Verband der Chromosomen herauslösen und irgendwo in der Zelle liegenbleiben. Sie bilden sich dann zu Kleinkernen und unregelmäßig geformten Kernsplittern, den sogenannten Karyomeren, um. Eine zusammenfassende Darstellung des cytologischen Erscheinungsbildes der C-Mitose findet sich bei LEVAN (1938) und TISCHLER (1951).

Alle diese Symptome, die von ENNIS (1948), DOXEY (1949) und DERENNE (1953) auch als Folgen der IPC-Wirkung angegeben werden, lassen sich, mit der obenerwähnten Einschränkung, in Kartoffelkeimen und -wurzeln nach IPC-Behandlung nachweisen. Weitaus am häufigsten sind zwei-, drei- und

mehrkernige Zellen. In einem Extremfall wurde eine Zelle mit neun Kernen beobachtet (Abb. 15). Auch multipolare Spindeln sind regelmäßig zu finden (Abb. 16). Polyploide Kerne[1]) treten dagegen erheblich seltener auf als bei anderen Pflanzen, und zwar am häufigsten noch bei den Sprossen (Abb. 17). Offenbar ist die Neigung zur Polyploidie bei der Kartoffel wegen ihrer ohnehin schon großen Chromosomenzahl gering, wie die Vervielfachung der Chromosomensätze ja auch bei anderen Pflanzen eine Grenze hat (TISCHLER 1951). Zum Beispiel bereitet bei Gerste die Vereinigung von mehr als vier Chromosomensätzen Schwierigkeiten, weshalb nach Colchicineinwirkung die Zahl der Kerne zunimmt, die schließlich 30 und mehr betragen kann. Bestätigt wird dies durch die Parallelversuche mit Colchicin, nach dessen Einwirkung bei der Kartoffel ebenfalls überwiegend mehrkernige Zellen auftraten.

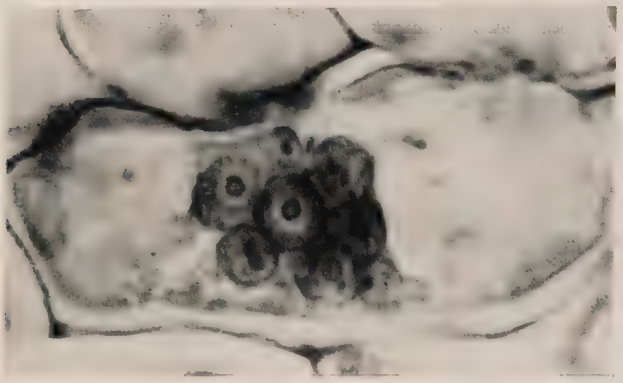


Abb. 15. Neunkernige Zelle, Längsschnitt durch eine Kartoffelwurzel nach 48stündiger Behandlung mit 0,005 % IPC (Vergr. 1600mal)

Auch die anderen, von ENNIS, DOXEY und DERENNE beschriebenen Kernteilungsanomalien waren hin und wieder zu beobachten, ebenso die charakteristischen Störungen der Metaphasekonfiguration, die entweder durch eine zerstreute Anordnung der Chromosomen in der Kernregion (scatters) oder, nach Einwirkung höherer Konzentrationen, durch die Verklumpung der Chromosomen (clumps) gekennzeichnet sind (HADDER und WILSON 1958).

Ein weiteres für die C-Metaphase typisches Merkmal, nämlich die Ausbildung x-förmiger C-Chromosomen infolge einer verzögerten Centromerentrennung, die nach ENNIS (1948) und DOXEY (1949) auch nach IPC-Einwirkung regelmäßig zu beobachten ist, wurde von uns nicht festgestellt. Das gleiche gilt für die Fragmentation der Chromosomen und Chromatiden, die nach DOXEY (1949) und DERENNE (1953) ebenfalls zu den charakteristischen Symptomen der IPC-Wirkung gehört. In beiden Fällen liegt der Grund wohl in der Ungunst des Objektes, da die geringe Größe der Chromosomen einen Einblick in ihren Bau erschwert.

Alle vorstehend beschriebenen Erscheinungen sind nur nach Einwirkung verhältnismäßig niedriger Konzentrationen zu beobachten, die das Wachstum

[1]) Die Polyploidie konnte aus den obengenannten Gründen nicht durch Auszählung der Chromosomen sichergestellt, sondern nur durch einen Größenvergleich mit den normalen Zellkernen der näheren Umgebung ungefähr ermittelt werden. Die gleichen Schwierigkeiten hatte ENNIS (1948) bei *Avena* (2 n = 42), weshalb er zum genaueren Studium der durch IPC verursachten Polyploidie *Allium cepa* als Versuchsobjekt benutzte.

zwar bereits hemmen, aber noch nicht völlig unterbinden. Nach Einwirkung höherer Konzentrationen oder nach einer entsprechenden Verlängerung der Einwirkungszeit ist dagegen eine Abnahme der Mitosenhäufigkeit festzustellen, infolge derer schließlich nur noch Ruhekerne zu finden sind. Es handelt sich hier also nicht um eine Fixierung, d. h. Abtötung der Zellen, da diese auch die gerade im Ablaufen begriffenen Kernteilungen erhalten würde. Offenbar werden lediglich die Ruhekerne am Eintritt in die Mitose gehindert, während die bereits begonnenen Teilungen, wenn auch zum Teil gestört, bis zum Ende ablaufen.

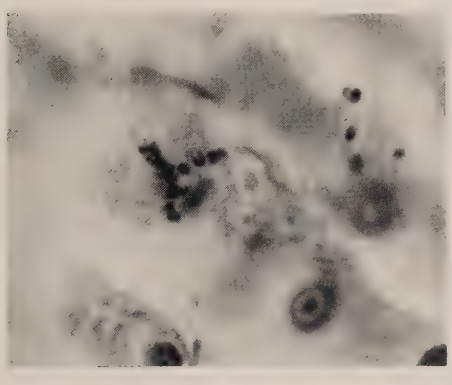


Abb. 16. Tripolare Spindel in Metaphase. Längsschnitt durch eine Kartoffelwurzel. Behandlung wie in Abb. 15 (Vergr. 1600mal)

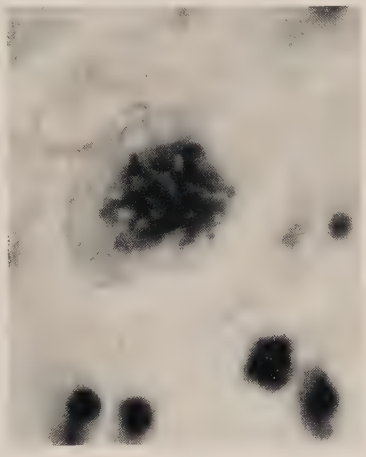


Abb. 17. Polyploide Zelle. Längsschnitt durch einen Kartoffelsproß nach 7tägiger Behandlung mit 0,001 % IPC (Vergr. 1600mal)

Für das IPC gibt es demnach, wenn wir von seiner bereits ausführlich besprochenen Cytotoxizität absehen, zwei Konzentrationsbereiche verschiedener cytologischer Wirkungen, von denen der eine durch stärkere cytologische Abnormitäten, der andere durch die völlige Unterbindung der Kernteilungsvorgänge charakterisiert ist. Der erstere liegt, bei 2stündiger Einwirkung, bei 0,001 bis 0,02 % IPC, der zweite oberhalb 0,02 %, was ungefähr mit dem in dem Wurzelwachstumstest ermittelten Konzentrationsbereich der Wachstumshemmung übereinstimmt (vgl. Tab. 1). Dies ist ein überzeugender Beweis dafür, daß die Störung bzw. Blockierung der Mitosen tatsächlich die primäre Ursache der Wachstums- und damit auch der Keimhemmung ist.

4. Zur Frage der biochemischen Ursachen der IPC-Wirkung

Über die biochemischen Ursachen der Mitosegiftwirkung wissen wir bis heute nur wenig. Zwar sind schon verschiedene Vorstellungen entwickelt worden, die zum Teil auch experimentell begründet sind, doch konnte bisher keine eine uneingeschränkte Anerkennung finden (Brachet 1957).

Als erster hat DUSTIN (1947) die Vermutung ausgesprochen, daß die mitosehemmende Wirkung der Carbamate mit dem Nukleinsäurestoffwechsel zusammenhängt. DOXEY (1949) konnte diese Auffassung zwar durch einige Beobachtungen stützen, kommt jedoch andererseits zu dem Schluß, daß die Störungen des Nukleinsäurestoffwechsels sicherlich nicht die alleinige und wahrscheinlich noch nicht einmal die primäre Ursache der Mitosestörungen sind. Durch neuere Befunde auf einigen anderen Forschungsgebieten haben aber die Anschauungen DUSTINS weiter an Wahrscheinlichkeit gewonnen. So gelang es SKIPPER und SCHABEL (1952), die durch das Urethan (Äthylcarbamat) verursachte Hemmung der Zellteilungen von *Escherichia coli* durch den Zusatz von 2,6-Diaminopurin aufzuheben, während Adenin als Antagonist des 2,6-Diaminopurins wirkte. BOYLAND und KOLLER (1954) konnten die Häufigkeit der durch Urethan ausgelösten atypischen Mitosen im Walker-Karzinom weißer Ratten durch Injektion von Thymin signifikant herabsetzen, während Diaminopurin ohne Einfluß blieb. ROF (1955) schließlich gelang es, die tumorauslösende Wirkung des Urethans bei Mäusen durch Applikation der Purinvorstufen Äthylformiat und Glycinäthylester herabzusetzen.

Eine andere Hypothese, die schon wiederholt vertreten worden ist (BARRON 1951, BRACHET 1957), nimmt eine Reaktion der Mitosegifte mit den Sulfhydrylgruppen der zelleigenen Thiolverbindungen an. Sie basiert auf der Beobachtung, daß die durch Quecksilberchlorid und andere SH-Gifte verursachte Mitosehemmung durch den Zusatz von Cystein oder anderen Thiolen wieder aufgehoben wird. Auch Colchicin und andere Mitosegifte sollen mit SH-Gruppen reagieren.

Diese Befunde veranlaßten uns, beide Vorstellungen an Hand einiger Experimente für den Fall des IPC nachzuprüfen. Hierzu bedienten wir uns des oben beschriebenen Kartoffelwurzeltestes, den wir nur insofern modifizierten, als alle Wurzeln, natürlich mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle, einheitlich für zwei Stunden mit einer 0,005%igen IPC-Lösung behandelt wurden. Wie wir wissen, setzt diese Behandlung das Wachstum auf 50 bis 70% des Kontrollwertes herab, ohne cytotoxische Schäden im Gefolge zu haben. Die einzelnen Ansätze unterschieden sich nun dadurch, daß gleichzeitig mit dem IPC die zu testenden Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen (mol) zur Einwirkung gelangten. Von den Purin- und Pyrimidinderivaten standen uns 2,6-Diaminopurin (als Sulfat), Adenin, Guanin und Thymin, von den Thiolverbindungen Cystein, Methionin und Glutathion zur Verfügung. Außerdem benutzten wir, in Anlehnung an die Versuche von ROF, ein Gemisch von Äthylformiat und Glycinäthylester im Verhältnis 1 : 1 (mol). Bei jedem Versuch blieb ein IPC-Ansatz als Hemmungsstandard ohne Zusatz. Nach Ablauf der Einwirkungszeit wurden die Wurzeln gemessen, in feuchte Kammern ausgelegt und nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 27 °C erneut gemessen. Die Meßwerte, ausgedrückt in Prozent der unbehandelten Kontrolle, dienen als Vergleichsgröße. Jeder Versuch wurde in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Ein IPC-Purin-Antagonismus müßte bei dieser Versuchsanordnung in einer Annäherung der Meßwerte der purinbehandelten Wurzeln an den Kon-

Tabelle 7

Versuche mit Purinderivaten und -vorstufen sowie Thymin zur Aufhebung der durch IPC verursachten Wachstumshemmung

Alle Wurzeln wurden 2 Stunden lang mit 0,005 % IPC behandelt.
Die Zahlen geben den Zuwachs in Prozent der unbehandelten Kontrolle an

Konz.	Wurzelzuwachs nach Zusatz von				
	Diamino-purin	Adenin	Guanin	Thymin	Äthylformiat u. Glycin-äthylester
0,001	42	61	56	58	62
0,0001	66	60	53	68	61
0,00001	75	69	69	52	69
0,000001	79	72	58	54	67
IPC-Standard	72	64	59	58	70

trollwert zum Ausdruck kommen. Das gleiche gilt für das Thymin. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, vermögen jedoch die getesteten Verbindungen die durch IPC verursachte Wachstumshemmung nicht aufzuheben, denn keiner der Einzelwerte zeigt einen größeren und bei mehrfacher Wiederholung signifikanten Unterschied zum IPC-Standard im Sinne einer Wachstumszunahme. 2,6 - Diaminopurin verstärkt bei 0,001 mol Anwendung die Wachstumshemmung sogar erheblich. Oberhalb dieser Konzentration zeigen alle geprüften Verbindungen eine hemmende Wirkung.

Tabelle 8

Versuche mit Thiolverbindungen zur Aufhebung der durch IPC verursachten Wachstumshemmung

Erklärungen siehe Tabelle 7

Konz.	Wurzelzuwachs nach Zusatz von		
	Cystein	Methionin	Glutathion
0,01	52	43	57
0,001	52	66	62
0,0001	50	69	50
0,00001	54	70	71
0,000001	48	61	51
IPC-Standard	57	64	58

Entsprechendes gilt für die Versuche mit den Thiolverbindungen (Tab. 8). Danach sind auch Cystein, Methionin und Glutathion nicht in der Lage, die durch 0,005 % IPC hervorgerufene Wachstumshemmung wieder aufzuheben. Ergänzend sei noch bemerkt, daß die einzelnen Versuchsreihen zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt wurden. Hieraus erklären sich die Schwankungen des IPC-Standards, der im Frühjahr durchweg etwas höhere Werte erreicht (60 bis 70 %) als im Herbst (50 bis 60 %).

Obwohl in diesen Versuchen nur eine begrenzte Anzahl der als Antagonisten in Frage kommenden Verbindungen geprüft wurde, was ihre Beweiskraft natürlich einschränkt, ergeben sich aus ihnen doch keinerlei Hinweise,

daß die durch IPC verursachte Mitosehemmung und die hieraus folgende Beeinträchtigung des Wachstums auf einer Reaktion des IPC mit den genannten Verbindungsklassen beruht. Es wird daher nötig sein, diese Frage noch genauer zu untersuchen.

DISKUSSION

Wie bereits eingangs erwähnt, waren es vor allem drei Punkte, die den Gegenstand der vorliegenden Arbeit bildeten:

1. Der Einfluß der Carbamate auf das Wachstum der Organe der Kartoffel,
2. die Eignung der carbamathaltigen Mittel zur Keimverzögerung bei Saatkartoffeln und
3. der Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen bei der Keimhemmung der Kartoffeln.

In Labor-, Gewächshaus- und Freilandversuchen wurde der Einfluß der Carbamate auf das Wachstum untersucht. Es zeigte sich, daß IPC und ÄPC das Längenwachstum der Wurzeln und Sprosse der Kartoffeln bereits in verhältnismäßig geringen, noch nicht cytotoxischen Konzentrationen stark hemmen. Dabei richtet sich der Angriff der Carbamate vor allem gegen die Zellteilungen, während das Streckungswachstum und die Differenzierungsvorgänge weniger empfindlich sind. Die Wachstums- und Keimhemmung ist also eine unmittelbare Folge der Einwirkung der Carbamate auf die Augen und Keime selbst, nicht etwa eine indirekte Folge einer nach Anreicherung der Wirkstoffe im Knollengewebe verursachten Atmungshemmung.

Der gute Erhaltungszustand der mit Keimhemmungsmitteln behandelten Kartoffeln läßt nun in der Praxis immer wieder die Frage laut werden, ob diese Mittel auch bei Saatkartoffeln angewandt werden können. Erwünscht ist eine Keimverzögerung bei Pflanzgut vor der Aussaat insofern, als eine stärkere Keimung das Auspflanzen erschwert und die Qualität des Pflanzgutes mindert. Natürlich kommen hierfür nur solche Mittel in Frage, die keine Ertragsminderung verursachen, deren keimhemmender Effekt nach Entfernung des Mittels also verlorengeht. Wie aus der eingangs gegebenen Literaturübersicht hervorgeht, sind die Meinungen über die Brauchbarkeit der Carbamate für diesen Zweck geteilt.

Die nachgewiesene Irreversibilität der Wachstums- und Keimhemmung bei längerer Einwirkungszeit und bei Anwendung höherer Konzentrationen machte eine Schädigung des Pflanzgutes durch die Carbamate wahrscheinlich. Hinzu kommt, daß sich nach den Ergebnissen des TTC-Testes IPC und ÄPC bei längerer Einwirkung im Gewebe der Augen und Keime der damit behandelten Kartoffeln in zunehmendem Maße anreichern, was schließlich deren Tod herbeiführt. Wenn derartige cytotoxische Effekte auch durch eine hinreichend niedrige Dosierung bzw. durch eine entsprechende Verkürzung der Einwirkungszeit sicherlich zu vermeiden sind, so können doch die Wachstumshemmungen, selbst wenn sie reversibel sind, eine erhebliche Verzögerung der Entwicklung verursachen, die sich dann im Ertrag auswirkt. Dabei ist zu beachten, daß zu niedrige Konzentrationen und Aufwandmengen, die von den Kartoffeln anstandslos vertragen werden (JACOB 1952), auch eine unbefriedi-

gende keimhemmende Wirkung zeigen, weshalb ihre Anwendung von zweifelhaftem Wert ist. Daher hat auch die Frage, ob eine Sorte mehr oder weniger empfindlich gegen die Carbamate ist, nur sekundäres Interesse. Denn eine weniger empfindliche Sorte erfordert zur Erzielung des gleichen keimhemmenden Effektes auch eine entsprechend größere Menge des Keimhemmungsmittels, so daß die Gefahr einer Schädigung hier genauso groß ist wie bei einer empfindlichen Sorte.

Tatsächlich schädigen, wie die Gewächshaus- und Freilandversuche gezeigt haben, beide Carbamate in allen Konzentrationen, die die Keimung merklich verzögern, schon nach einer Einwirkungszeit von wenigen Wochen die Entwicklung der Kartoffelpflanzen deutlich und rufen auch eine entsprechende Ertragsminderung hervor. Entgegen der Ansicht einiger anderer Autoren muß deshalb vor einer Anwendung der Carbamate, insbesondere aber des IPC, zur Keimverzögerung bei Pflanzkartoffeln nachdrücklich gewarnt werden, da auch die sorgfältige Beachtung aller Vorsichtsmaßregeln keine Sicherheit gegen schwere Rückschläge bietet.

Wenden wir uns nun der Frage des Wirkungsmechanismus der beiden Carbamate zu. Wie bereits erwähnt, kommt eine spezifische Hemmung der Atmungsfermente als Wirkungsursache nicht in Frage (Nultsch 1958, 1959 c), doch schließt dies die Möglichkeit einer Beeinträchtigung anderer als der untersuchten Fermente natürlich nicht aus. Tatsächlich werden von einigen Autoren bestimmte fermentative Reaktionsabläufe als Angriffspunkte der Urethane auf den Zellstoffwechsel in Erwägung gezogen. Boyland und Koller (1954) vermuten, daß das Äthylurethan die Thyminsynthese durch die Hemmung der Transmethylierungsvorgänge unterbricht. Eine solche Wirkungsweise ist allerdings nach unseren Untersuchungen im Falle des IPC ebenso unwahrscheinlich wie die Vermutungen von Doxey (1949) und Lefèvre (1939), wonach die Ursache der Mitosegiftwirkung der Carbamate in der Hemmung der Atmungsfermente liegen soll.

In diesem Zusammenhang müssen noch neuere Untersuchungen amerikanischer Forscher (Anonymus 1958) Erwähnung finden, nach denen die herbizide Wirkung der N-Phenylcarbamate auf die Hemmung des ersten Photosyntheseschrittes zurückzuführen ist. Auch Wessels und van der Veen (1956) haben schon über die Beeinträchtigung der Photosynthese durch ÄPC berichtet, als deren Ursache sie die Hemmung der Hill-Reaktion fanden. Wir haben allerdings dieser Frage keine Aufmerksamkeit geschenkt, denn obwohl auch blaugrüne und dunkelgrüne Verfärbungen ÄPC-behandelter Pflanzen als Folgen einer Urethanbehandlung bekannt sind (Friesen 1929, Ennis 1948), die auf Chlorophyllschädigungen und damit ebenfalls auf eine Beeinträchtigung der photosynthetischen Leistung schließen lassen, kommt doch die Beeinflussung der Photosynthese als wirksames Prinzip der Wachstumshemmung farbloser Keime und Keimanlagen nicht in Frage. Wie weit diese Vorgänge für die Hemmung des Wachstums der bereits stärker entwickelten und ergrünten Kartoffelsprosse von Bedeutung sind, läßt sich im Augenblick nicht entscheiden, gehört aber auch nicht unmittelbar zu dem hier interessierenden Fragenkomplex.

Als primäre Ursache der Keim- und Wachstumshemmung wurde die Mitosegiftwirkung des IPC erkannt. Obwohl die Kartoffel wegen ihrer verhältnismäßig kleinen und zahlreichen Chromosomen ein für cytologische Untersuchungen wenig geeignetes Objekt ist, konnten doch nach IPC-Einwirkung fast alle typischen Symptome gefunden werden, die das IPC als Mitosegift, und zwar speziell als C-mitotisches Agens im Sinne von LEVAN (1938) und HADDER und WILSON (1958) charakterisieren. Im einzelnen waren es die folgenden Merkmale:

1. Die Bildung von sogenannten C-Tumoren an Sprossen und Wurzeln,
2. Störungen der Metaphase, gekennzeichnet durch eine zerstreute Anordnung der Chromosomen (scatters) bzw. durch Chromosomenverklumpungen (clumps), und
3. die teilweise oder völlige Unterdrückung der Spindelfunktion.

Nicht beobachtet wurden bis jetzt, wohl infolge der Ungunst des untersuchten Objektes, die für die C-Metaphase charakteristische Bildung der x-förmigen C-Chromosomen sowie die für die IPC-Wirkung bei anderen Objekten beschriebene Erscheinung der Chromosomen- und Chromatidenfragmentation.

In höheren Konzentrationen reduziert das IPC die Mitosenhäufigkeit, indem es die Ruhekerne am Eintritt in die Mitose hindert, während bereits im Gang befindliche Teilungen, wenn auch mehr oder weniger gestört, bis zum Ende ablaufen. Als Beweis dafür, daß die beschriebenen Mitosestörungen wirklich die Ursache der Keim- und Wachstumshemmung darstellen, ist die Tatsache anzusehen, daß sich der Konzentrationsbereich der Mitosestörungen mit dem der Wachstumshemmung deckt. Die starke Cytotoxizität der Carbamate, die sicherlich mit für die Irreversibilität der Keimhemmung verantwortlich ist, kommt als deren eigentliche Ursache nicht in Frage, da die am Austreiben gehinderten Keime zunächst noch voll lebensfähig sind.

Unseren Versuchen, in die biochemischen Ursachen der Mitosegiftwirkung des IPC etwas Licht zu bringen, war kein Erfolg beschieden. Jedenfalls vermochten wir nicht, die von DUSTIN (1947) angenommene Störung der Nukleinsäuresynthese experimentell sicherzustellen. Ebenso konnten wir die Hypothese BARRONS (1951), wonach die Wirkung der Mitosegifte auf ihre Reaktion mit den SH-Gruppen der zelleigenen Thiolverbindungen zurückzuführen ist, für den Fall der Carbamate nicht bestätigen. Die Frage nach den biochemischen Ursachen muß daher vorerst noch offenbleiben.

Fassen wir zusammen, so ergibt sich hinsichtlich der Wirkungsweise des IPC bei der Keimhemmung folgende Vorstellung: Die als Pulver zwischen die gelagerten Kartoffeln gestreute Substanz verdampft allmählich, dringt infolge ihrer Lipoidlöslichkeit in das Gewebe der Keime und Augen ein und reichert sich hier an. Dies führt zu Mitosestörungen, die zunächst eine Verzögerung und schließlich die völlige Einstellung des Wachstums zur Folge haben. Entfernt man zu diesem Zeitpunkt das IPC und legt die Kartoffeln in Erde aus, so treiben die Keime, wenn auch verlangsamt, im großen und ganzen normal aus. Die Mitosestörungen sind also in der ersten Zeit noch

reversibel. Steigt die Konzentration des IPC im Gewebe der Augen und Keime weiter an, sind die Mitose- und Wachstumshemmungen nicht mehr rückgängig zu machen, und es kommt schließlich zu schweren Schädigungen, die cytologisch in der völligen Desorganisation des Protoplasten und physiologisch im Ausbleiben der TTC-Reduktion und in der Beeinträchtigung der Atmung ihren Ausdruck finden. Die Turgeszenz der Zellen geht zwar nicht gleich verloren, doch tritt der Tod nur wenig später ein, und unter brauner bis schwarzer Verfärbung fallen die Augen und Keime der völligen Zerstörung anheim. Das Gewebe der Kartoffelknolle, durch die dicke Korkschicht fast hermetisch abgeschlossen, bleibt von diesen Vorgängen unberührt. Erst wenn im Frühjahr normalerweise die Keimung einsetzt, wird auch das Knollengewebe indirekt beeinflußt, indem der üblicherweise von den Augen ausgehende Impuls zum Abbau der Reservestoffe und zur Bereitstellung der für das Austreiben erforderlichen Energie ausbleibt. Infolgedessen bleiben die Kartoffeln nicht nur äußerlich frisch und prall, sondern behalten auch ihren Nährwert.

Zusammenfassung

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluß von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) und Äthyl-N-phenylcarbamat (ÄPC) auf das Wachstum der Sprosse und Wurzeln der Kartoffeln zu untersuchen. In Labor-, Gewächshaus- und Feldversuchen verursachten beide Verbindungen eine starke Wachstumshemmung, die schon unterhalb des toxischen Konzentrationsbereiches einsetzt.

In den Wurzelwachstumstesten war die wachstumshemmende Wirkung des IPC etwa dreimal so stark wie die des ÄPC. Die Bestimmung des Zuwachses in den einzelnen Wachstumszonen der Wurzel ergab eine ungleich stärkere Wachstumshemmung der Wurzelspitze, d. h. der Zone der Zellteilungen. Das Streckungswachstum und die Differenzierungsvorgänge sind weniger empfindlich.

Die Keimfähigkeit und das Sproßwachstum der Kartoffeln werden mit steigender Konzentration und Behandlungsdauer in zunehmendem Maße gehemmt, auch wenn die äußerlich anhaftenden Reste der Carbamate vor dem Auspflanzen entfernt werden. In diesem Falle war das IPC etwa zehnmal so wirksam wie das ÄPC. In niedrigen Konzentrationen tritt eine Erhöhung der Sproßzahl bei gleichbleibendem oder gar abnehmendem Gesamtsproßgewicht auf, und zwar bei ÄPC viel ausgeprägter als bei IPC. Nach längerer Einwirkung verursachen aber auch die niedrigen Konzentrationen Wachstumshemmungen. Vor einer Anwendung der Carbamate als Keimverzögerungsmittel bei Pflanzkartoffeln muß daher gewarnt werden.

Morphologisch manifestiert sich die Behandlung mit Carbamaten in der Ausbildung keulenförmiger Anschwellungen der Wurzeln und Sprosse, der sogenannten C-Tumoren. Als primäre Ursache der durch IPC verursachten Keim- und Wachstumshemmung wurde die Mitosegiftwirkung dieser Verbindung erkannt. In niedrigen Konzentrationen ruft IPC die gleichen cytologischen Veränderungen hervor, die man bei der Behandlung mit C-mitoti-

schen Agenzien erhält, z. B. C-Metaphasen, multipolare Spindeln, vielkernige Zellen, Hemmungen der Anaphasebewegung und andere Störungen des Spindelmechanismus. Polyploide Zellen treten in geringerer Zahl auf. In höheren Konzentrationen vermindert das IPC die Mitosenhäufigkeit. Die Mehrzahl der Zellen wird in der Interphase blockiert, während die vor dem Einsetzen der Behandlung begonnenen Zellteilungen zwar gestört, nicht aber blockiert werden. Allgemein treten die Mitosestörungen bei den gleichen Konzentrationen ein, die auch das Wachstum hemmen oder verhindern.

Bei ununterbrochener Einwirkung reichern sich die Carbamate im Gewebe der Augen und Keime in Konzentrationen an, die deren Tod herbeiführen. Obwohl die toxische Wirkung dieser Verbindung sicherlich mit für die Irreversibilität der Keimhemmung verantwortlich ist, kommt sie doch als deren primäre Ursache nicht in Frage.

Die biochemische Wirkungsweise der Carbamate ist noch ungeklärt. Die Wachstumshemmung wird weder durch Purine und Thymin noch durch Thiole aufgehoben. Es besteht somit kein Anlaß zu der Annahme, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den genannten Verbindungen und der IPC-Wirkung besteht, wie DUSTIN, BARRON u. a. annehmen. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage sind erforderlich.

Summary

The purpose of the present investigation was to determine the effects of isopropyl-N-phenylcarbamate (IPC) and ethyl-N-phenylcarbamate (EPC) upon sprout and root growth of potatoes. In laboratory, greenhouse and field trials both exerted a strong growth inhibiting effect even at doses which have no toxic activity.

In measurements of root-growth inhibition IPC proved to be about three times as active as EPC. The determination of the rate of growth in several parts of the root showed a most strong inhibition of the root-tip, i. e. the zone of cell division. The longitudinal growth and the process of cell differentiation are less sensitive.

The capacity of sprouting and the sprout-growth of potatoes are inhibited in the same degree as concentration and time of treating increase, even if the residues of the carbamates are removed before planting. In this case IPC was found to be about ten times as active as EPC. At a low dosage an increase in the number of sprouts occurs, while the sprout-weight remains equal or decreases. This effect is more distinct in the case of EPC than IPC. After longer treatments even the lower concentrations retard the growth. For this reason carbamates should not be used as sprout inhibitors for seed potatoes.

The morphological effect of the treatment with carbamates was shown by the roots and sprouts developing club-shaped swellings, so-called c-tumours. The primary cause of inhibition of sprouting and growth exerted by IPC is the mitotic poisoning. At lower concentrations IPC produces cytological abnormalities which strongly recall those which are contained by

treating with c-mitotic agents, e. g. c-metaphases, multipolar spindles, multinucleated cells, inhibition of the anaphase movement and other disturbances of the spindle mechanism. Polyploid cells occur in smaller numbers. At higher concentrations IPC produces a marked decrease of the mitotic index. The majority of cells are blocked in interphase, while the cell divisions which have started before the treatment begins are disturbed but not arrested. Generally the mitotic abnormalities occur at the same concentrations which retard and prevent the growth.

Under continuous exposure the carbamates accumulate in the tissues of buds and sprouts at a level that causes death. The irreversibility of sprout inhibition is obviously due to the toxic action of this compound, but the death of buds cannot be said to be the primary cause of sprout-inhibition.

The biochemical mode of action of carbamates remains obscure. The growth-inhibition is not reversed by addition of purines, thymine and sulphhydryl compounds, and thus there is no evidence, that a cause-and-effect relationship between these compounds and the IPC-action exists as pointed out by DUSTIN, BARRON et al. Further investigations concerning this problem are necessary.

Literaturverzeichnis

ANONYMUS, 1958: Wirkungsweise einiger Unkrautvertilgungsmittel aufgeklärt. Chem. Ind. **10**, 184.

BARRON, E. S. G., 1951: Tiol groups of biological importance. Advances Enzymol. **11**, 201—266.

BATTAGLIA, E., 1949: Sull'azione citologica dell'etil-carbamato (uretano) e del cicloesil-carbamato. Caryologia **1**, 229—247.

BOYLAND, E., and P. C. KOLLER, 1954: Effects of urethane on mitosis in the Walker rat carcinoma. Brit. J. Canc. **8**, 677—684.

BRACHET, J., 1957: Biochemical Cytology. Acad. Press Inc. Publishers, New York.

DERENNE, P., 1953: Effets morphologiques, physiologiques et cytologiques dus á l'action de l'isopropylphénylcarbamate sur les genres *Allium, Vicia* et *Hordeum*. Bull. de l'inst. Agron. et des Stat. de Rech. de Gembloux **21**, 37—57.

DETTWEILER, C., 1948: Chemische Methoden der Kartoffelkonservierung. Kartoffelwirtschaft **1**, 67—68.

— —, 1952 a: Keimhemmungsmittel und Physiologie der Kartoffelknolle. Mitt. BZA Berlin-Dahlem H. 74, 90—92.

— —, 1952 b: Zusammenhänge zwischen Austreiben und Atmung bei der Kartoffelknolle. I. Mitt. Die Hemmung des Austreibens durch Fermentinhibitoren, insbesondere Urethane. Planta **41**, 214—239.

DOXEY, D., 1949: The effect of isopropyl phenyl carbamate on mitosis in rye (*Secale cereale*) and onion (*Allium cepa*). Ann. Bot. NS **13**, 329—335.

DUSTIN, P., 1947: Some new aspects of mitotic poisoning. Nature **159**, 794—797.

ENNIS, W. B., 1948: Some cytological effects of O-isopropyl N-phenyl carbamate upon *Avena*. Amer. J. Bot. **35**, 15—21.

FISCHNICH, O., und C. PÄTZOLD, 1956: Keimhemmung bei Kartoffeln durch chemische und physikalische Maßnahmen. Landbouwk. T. **68**, 879—894.

— —, und F. WOLLNER, 1951: Über den Einfluß keimhemmender Substanzen auf Pflanzkartoffeln. Schriftenr. d. FAL Braunschweig-Völkenrode **3**, 115—164.

FRIESEN, G., 1929: Untersuchung über die Wirkung des Phenylurethans auf Samenkeimung und Entwicklung. Planta **8**, 666—679.

GEITLER, L., 1949: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. 3. Aufl. Wien.

HADDER, J. C., and G. B. WILSON, 1958: Cytological assay of c-mitotic and prophase poison actions. Chromosoma **9**, 91—104.

HOFFERBERT, W., 1948: Keimverzögerungsversuche mit Agermin und Belvitan bei Pflanzkartoffeln. Kartoffelwirtschaft **1**, 70.

HOHL, K., 1947: Die Beeinflussung der Mitose durch Urethan. Experientia **3**, 109—110.

HÜTTIG, W., 1933: Über physikalische und chemische Beeinflussungen des Zeitpunktes der Chromosomenreduktion bei Brandpilzen. Z. Bot. **26**, 1—26.

JACOB, E., 1952: Anwendung von Keimhemmungsmitteln bei Pflanzkartoffeln. Deutsch. Landwirtsch. **3**, 241—244.

KÜSTER, F., 1946/47: Urethan als Mitosegift. Klin. Wschr. 24/25, 664.

LEFÈVRE, J., 1939: Similitude des actions cytologiques exercées par le phényluréthane et la colchicine sur des plantules végétales. C. R. de Acad. Sci. **208**, 301—304.

LEVAN, A., 1938: The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. Hereditas **24**, 471—486.

MOEWUS, F., 1949: Der Kressewurzeltest, ein neuer quantitativer Wuchsstofftest. Biol. Zbl. **68**, 118—140.

NULTSCH, W., 1954: Über die Verwendung des Tetrahydrofurans in der mikroskopischen Technik. Wiss. Z. Univ. Halle, Math. Nat. **4**, 161—164.

— —, 1958: Untersuchungen über den Einfluß von Keimhemmungsmitteln (Carbanilsäureestern) auf das Kartoffelgewebe. Angew. Bot. **32**, 27—44.

— —, 1959 a: Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) bei der Keimhemmung der Kartoffeln. Habil. Schr. Halle.

— —, 1959 b: Versuche zum Nachweis von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) an und in behandelten Kartoffelknollen. Angew. Bot. **33**, 10—18.

— —, 1959 c: Zur Frage des Einflusses von Isopropyl-N-phenylcarbamat (IPC) auf die Atmungsfermente der Kartoffel. Angew. Bot. **33** (im Druck).

OEHLKERS, F., 1946: Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. Biol. Zbl. **65**, 176—186.

OVERTON, E., 1901: Studien über die Narkose. Jena.

PERLASCA, G., 1956: Chemical control of sprouting in white potatoes. Amer. Potato J. **33**, 113—133.

QUANTZ, L., 1948: Erfahrungen mit neuen chemischen Konservierungsmitteln. Kartoffelwirtschaft **1**, 68—70.

— —, 1949: Versuche mit neuen Keimhemmungsmitteln. Nachr.-Bl. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **1**, 97—101.

ROE, F. J. C., 1955: Tumour-initiating action of urethane and its inhibition by purine precursors. Nature **175**, 636—637.

RHODES, A., W. A. SEXTON, L. G. SPENCER and W. G. TEMPLEMAN, 1950: Use of isopropylphenylcarbamate to reduce sprouting of potato tubers during storage. Research **3**, 189—190.

SCHÖMMER, F., 1949: Kryptogamenpraktikum. Stuttgart.

SCHULE, W., O. FISCHNICH, F. WOLLNER und A. GORSLER, 1951: Die Keimstimmung der Kartoffel und ihre Bedeutung für die Züchtung und Pflanzguterzeugung. Schriftenreihe d. Forschungsanst. f. Landw. Braunschw.-Völkenrode, H. 3.

SEGELITZ, G., 1938: Der Einfluß von Licht und Dunkelheit auf Wurzelbildung und Wurzelwachstum. Planta **28**, 617.

SKIPPER, H. E., and F. M. SCHABEL, 1952: Reversal of the growth inhibitory action of urethan by 2.6-Diaminopurine. Arch. Biochem. Biophys. **40**, 476—478.

SÖDING, H., 1952: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart.

TISCHLER, G., 1951: Kernteilung und Kernverschmelzung. In Handb. d. Pflanzenanatomie, Allgem. Teil: Cytologie, Bd. II, Allg. Pflanzenkaryologie, 2. Hälfte. 2. Aufl.

WENZL, H., 1954: Beitrag zur Prüfung von Kartoffelkeimhemmungsmitteln. Pflanzenschutzberichte Wien **13**, 79—83.

WESSELS, J. S. C., and R. VAN DER VEEN, 1956: The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1.1-dimethylurea on the Hill reaction. Biochim. Biophys. Acta **19**, 548—549.

Besprechungen

Gäumann, E., Die Rostpilze Mitteleuropas mit besonderer Berücksichtigung der Schweiz (Band XII der Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz). Büchler und Co., Bern 1959. 1407 Seiten, 90 Tabellen, 1075 Abbildungen, Preis sFr. 60,—.

Von jeher hat GÄUMANNS besondere Liebe den Uredineen gehört. Auf der Höhe seines Forscherlebens beschenkt er nun die Fachwelt mit einer Monographie der mitteleuropäischen Vertreter dieser reizvollen Pilzgruppe, die höchste Anerkennung hervorruft. Diese gilt sowohl der rein technischen Bearbeitung des ungeheuren Materials und der nahezu schon unübersehbar gewordenen Literatur, der das Vermögen eines Einzelnen kaum noch gewachsen ist, wie insbesondere der logischen und kritischen Gliederung und Sichtung des so schwer zu entflechtenden Stoffes. Die divergierenden taxonomischen Neigungen der Mykologen haben uns ja im Laufe der letzten Jahrzehnte ein nomenklatorisches Chaos beschert, das dem Phytopathologen in zunehmendem Maße — euphemistisch ausgedrückt — Unbehagen bereitet. Wir finden in der Uredinologie (wie in der gesamten Mykologie) einerseits die analytische Tendenz, Einheiten einer Spezies, die ihr eigenes Wirtsspektrum haben und anscheinend auch gewisse morphologische Unterschiede aufweisen, zum Range von Kleinarten oder sogar Arten zu erheben und sie mit eigenem Namen zu belegen. In extremen Fällen führt das sogar dazu, daß morphologisch identische heterözische Roste als verschiedene Spezies angesprochen werden, wenn sie in der Wahl ihres Ädidienwirtes differieren. Andererseits herrscht das Bestreben der Synthese, der Wunsch, die Spezies nur auf einer rein morphologischen Basis zu gründen, nachdem uns die Forschung der letzten Jahrzehnte in zunehmendem Maße die Fragwürdigkeit vieler bisher taxonomisch verwerteter Daten offenbart hat. Das gilt sowohl für die physiologische Spezialisierung, die viel weiter geht, als wir uns je vorgestellt haben, und immer wieder mannigfache Überschneidungen der Wirtsspektren zeigt, und das gilt gleicherweise für die morphologischen Merkmale der Sporendimensionen, der Sporenwanddicke usw., die außerordentlich variabel sind. Demgemäß werden heute viele der früher als selbständig angesehenen Arten als Formae speciales, Rassen oder dergleichen zu größeren Sammelarten zusammengefaßt. Es wird nach menschlichem Ermessen nicht möglich sein, zwischen diesen gegensätzlichen Anschauungen ein Kompromiß zu finden, das beide Seiten zufriedenstellt. Der Phytopathologe wird einerseits jedes Bestreben begrüßen, das dahin geht, offenbaren nomenklatorischen Ballast über Bord zu werfen, er wird sich aber andererseits aus praktischen Erwägungen ungern dazu bereit finden, eine jahrzehntelang eingebürgerte Spezies in rigoroser Konsequenz derartiger Maßnahmen als Synonym in einer übergeordneten Kollektivart sang- und klanglos aufgehen zu lassen.

GÄUMANN faßt den Artbegriff eng im Sinne von JORDAN. Er stellt offensichtlich verwandte Arten und Kleinarten zu Artengruppen und Formenkreisen zusammen. Auf diese Weise schafft er nicht nur eine den praktischen Belangen gerecht werdende Ordnung, sondern befriedigt auch die entwicklungsgeschichtlichen Interessen, da er alle mutmaßlich genetisch zusammengehörigen Arten, z. B. auch die aus makrozyklischen Arten hervorgegangenen Mikroformen, zusammenfaßt. Lediglich *Endophyllum* hat er aus dieser Eingliederung herausgenommen und zunächst noch als Formgattung bestehen lassen.

Inwieweit man GÄUMANN in der Beibehaltung vieler Arten und Kleinarten folgen soll, ist nach dem oben Gesagten eine Ermessensfrage. Unter den größten Sorgenkindern aus dem mißratenen Nachwuchs der Uredinologen seien hier als Beispiel die Salicifloren bewohnenden *Melampsora*-Arten angeführt. GÄUMANN trennt in zwei Gruppen, die Gruppe der *Melampsora populina* (Pers.) Lév. und die Gruppe der *M. salicina* Lév., die jeweils nach dem unterschiedlichen Haplontenwirt in 5 und (einschließlich der autöcischen

M. amygdalinae Kleb.) 14 Formenkreise aufgeteilt werden. Innerhalb der Formenkreise teilt er, wo erforderlich, in weitere Arten auf, die sich morphologisch oder nach den Spezies ihrer Haplontenwirtsgattung unterscheiden sollen. Da die meisten dieser Roste sich in der Dikaryophase morphologisch überzeugend nicht trennen lassen, neigen viele Autoren heute dazu, die Arten mit unterschiedlichem Äcidienwirt als Formae speciales, Rassen oder Rassengruppen den Kollektivarten *M. populnea* (Pers.) Karst. und *M. epitea* Thuem. zuzuordnen. Wie gesagt, das ist ein Problem, über das sich streiten läßt, über das gestritten wird und für das eine befriedigende Lösung nicht zu sehen ist. Gerade bei solchen riesigen Gruppen, z. B. auch der Gruppe der *Carex*-Puccinien, wird der Wunsch nach einer übersichtlichen Ordnung mit dem Bestreben, die Taxonomie konsequent zu handhaben, immer zu Konflikten führen.

Im einzelnen ist zu dem vorliegenden Werk noch folgendes zu sagen:

Gäumann teilt die Rostpilze in sechs Familien: *Pucciniastraceae, Cronartiaceae, Chrysomyxaceae, Coleosporiaceae, Melampsoraceae* und *Pucciniaceae*. Die großen Gattungen *Uromyces* und *Puccinia* werden nach dem Verhalten der Teleutosporen (festgestielt, abfallend) in je zwei Sektionen gegliedert. Bei den einzelnen Arten beschränkt sich der Verf. nicht auf eine exakte morphologische Beschreibung, sondern bringt auch die wichtigsten Daten zur Biologie sowie zur Systematik und Nomenklatur. Dadurch wird der Wert des Werkes ungemein erhöht; es geht weit über den Begriff einer Systematik hinaus und stellt eine Fundgrube für jeden Uredinologen und Pathologen dar. In einem Punkt vermag Ref. dem Verf. nicht zu folgen. Gäumann spricht wie in seinen früheren Büchern und anderen Veröffentlichungen über Rostpilze stets von Spermogonien. Nach Tulasne sind unter Spermogonien und Spermatien männliche Geschlechtsorgane und männliche Geschlechtszellen zu verstehen. Eine solche Definition trifft aber bekanntlich für die Pyknidien und Pyknidiosporen nicht zu.

Über manche nomenklatorischen Regeln setzt sich Gäumann, sehr oft zur stillen Freude der Pathologen, mit souveräner Geste hinweg, womit er im nomenklatorischen Olymp Mißfallen erregen, aber, wie wir ihn kennen, auch ertragen wird. So nennt er unter Mißachtung dessen, daß es nach den internationalen Nomenklaturregeln keine *nomina specifica conservanda* gibt, den Weizenbraunrost nach seinem seit Jahrzehnten eingebürgerten und in weitesten Kreisen fest verwurzelten Namen *Puccinia triticina*, den Gelbrost *P. glumarum*, oder unter den Wirtspflanzen die Fichte *Picea excelsa*, den Weizen *Triticum vulgare* usf. Ebenso ignoriert er Artikel 69 der Nomenklaturregeln und führt den Entdecker eines Rostes unter den Autorennamen auf, auch wenn er die Hauptfruchtform noch nicht beschrieben hatte.

„Die Rostpilze Mitteleuropas" sind eine Meisterschöpfung Gäumanns, die sich seinen früheren wissenschaftlichen Werken würdig anreiht. Mag man als Mykologe oder Uredinologe im einzelnen hier und da eine andere Auffassung vertreten, kann man dem Verf. die uneingeschränkte Bewunderung nicht versagen und wird ihm höchsten Dank zollen. Es ist unnötig hervorzuheben, daß dieses bedeutende Werk in jede Fachbibliothek gehört.

Hassebrauk, Braunschweig

Handbuch der Pflanzenphysiologie. Herausgegeben von W. Ruhland. Band XVII, Teil 1: Bewegungen durch Einflüsse mechanischer und elektrischer Natur sowie durch Strahlungen. Redigiert von E. Bünning. XVI + 716 S., 513 Abbildungen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959. DM 216,— (Subskriptionspreis DM 172,80).

Der 3. Teil des Handbuchs umfaßt Wachstum, Entwicklung und Bewegung der Pflanze. Hierfür sind 5 Bände vorgesehen. Der zu besprechende Band ist der zuerst erschienene Teilband dieser Reihe und bringt einen Teil der Bewegungserscheinungen. Wie der Bandherausgeber in der Einleitung ausführt, kann die Einteilung der Bewegungserscheinungen nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen und muß so natürlich willkürlich sein. Aus dem Inhaltsverzeichnis geht hervor, daß der Darstellung „eine Einteilung nach den die Bewegung regulierenden inneren und äußeren ‚Reizen'" zugrunde liegt. Diese

Einteilung erscheint vorteilhaft, „weil hierbei bestimmte physiologische Phänomene zusammengefaßt werden können ...". Wie auch aus dem beigegebenen Inhaltsverzeichnis des 2. Teilbandes zu ersehen ist, richten sich die Hauptabschnitte beider Teile konsequent nach diesem Einteilungsprinzip mit Ausnahme der Kapitel über die durch das Licht ausgelösten Vorgänge. Hier werden aus nicht einzusehendem Grunde Unterabschnitte wie Phototaxis (Haupt, Clayton), Photodinese (Haupt), Reizbewegungen der Spaltöffnungen (v. Guttenberg, Heath, Stålfelt), Phototropismus und Photonastie (Banbury, Brauner, Galston) zu gleichwertigen Hauptabschnitten.

Den Beschreibungen der einzelnen Bewegungsvorgänge gehen allgemeine Ausführungen über Gesetze und Phänomene der Bewegungsphysiologie (Bünning), des Erregungsvorganges und der Mechanismen der Krümmungsbewegungen (Umrath) voraus. (Auf Seite 9, Zeile 18 von oben muß es „durch" statt „dadurch" heißen.) Über die Wirkung von Wundreizen berichtet Bünning. Umrath und Schrank teilen sich in der Darstellung der Wirkung elektrischer Reize, Kapitel über Seismo- und Thigmoreaktionen folgen (Baillaud, Bünning, v. Guttenberg, Umrath). — In der Einleitung wird klar zwischen Thigmotropismus und Thigmonastie bei Ranken unterschieden, weshalb wird darauf in dem Kapitel „Ranken" nicht näher eingegangen? — Den breitesten Raum nehmen die durch Licht bedingten Bewegungserscheinungen ein (300 Seiten), obwohl z. B. der Abschnitt über den Phototropismus höherer Pflanzen nur „kurz gefaßt" ist. Eine eingehende Darstellung der tagesperiodischen Bewegungen durch Bünning beschließt den vorliegenden 1. Teil des Bandes. Namen- und zweisprachiges Sachregister nehmen zum Unterschied von den meisten der bisher erschienenen Bände nur etwas über 8 % des Gesamtumfanges ein!

Wie der Bandherausgeber bereits betont, sind die einzelnen Berichte sehr unterschiedlich ausgefallen. Der „erreichte Umfang" — der einzelnen Berichte — „gibt durchaus kein richtiges Bild von der relativ größeren oder geringeren Bedeutung dieses Gebietes im Rahmen der pflanzenphysiologischen Forschung". Trotzdem kann man das Ganze als gelungen bezeichnen. Besonders hervorzuheben ist in vielen Kapiteln — besonders in denen des Bandherausgebers — die Berücksichtigung der historischen Seite und die anatomische Unterbauung der physiologischen Vorgänge.

Mit jedem neuen Bande erscheint das dargestellte Gesamtbild der Pflanzenphysiologie abgerundeter, und manche zunächst in ein oder dem anderen Band empfundene Lücke schließt sich. So dürfte zusamnem mit den entsprechenden Abschnitten in Band III die gebotene Darstellung der Spaltöffnungsphysiologie jetzt wirklich erschöpfend sein. Wir können hier nur dem Herausgeber und den einzelnen Bandredakteuren dafür unseren Dank aussprechen.

H. Drawert, Berlin-Dahlem

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, **Heft 95:**

Steiner, P., und W. Gruch, Zur Toxikologie der Insektizide. Literaturübersicht, 1. Teil: Dien-Gruppe. 1959. 118 Seiten, 42 Tabellen. Kartoniert DM 9,70. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg.

Fachleute und Laien beschäftigen sich heute nicht zuletzt infolge einseitig aufbauschender Berichterstattung in zunehmendem Maße mit den „hygienischen Nebenwirkungen" der Pflanzenschutzmittel. Wer sich an Hand einwandfreien Tatsachenmaterials über diese Fragen ein kritisches, aber objektives Urteil erarbeiten wollte, war auf ausländisches Schrifttum, oft auf verstreute Angaben in den verschiedensten Zeitschriften angewiesen; es ist den Verfassern und der Biologischen Bundesanstalt sehr dafür zu danken, daß mit dem vorliegenden Heft eine Reihe von Sammelberichten zur Toxikologie der Insektizide herauskommt, die uns die verstreuten Tatsachen nüchtern vor Augen führt und uns konkrete Zahlen an die Hand gibt, die auch im Einzelfall kritische Stellungnahme ermöglichen. In dem vorliegenden Heft sind für die Diengruppe (Aldrin, Dieldrin, Endrin, Isodrin, Chlordan, Heptachlor, Hexachlorxyclopentadien) neben den chemisch-physikalischen

Daten und der Anwendungsweise, die Toxizität für Säuger, Vögel und Fische, die Pharmakologie, Biochemie und Pathologie, die Toleranzwerte und Karenzzeiten zusammengestellt sowie Angaben über Speicherung und Ausscheidung, Gegenmaßnahmen usw. beigefügt. Vergiftungen an Menschen sind, soweit näher beschrieben, ausführlich mit Krankheitsbericht wiedergegeben. Ihre geringe Zahl und ihr oft gutartiger Ausgang mag zu sachlicher Betrachtung dieser ernsten Probleme führen! Dies sowie eifriger Gebrauch dieser nützlichen Datensammlung aus über 300 Einzelarbeiten mag den Autoren für ihre Mühe danken.

Fuchs, Göttingen

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, **Heft 96:**

Körting, A., Biologische Untersuchungen über die Entwicklung von *Hylotrupes bajulus* L. (Hausbockkäfer). 1959. 35 Seiten, 15 Tabellen, 7 Abbildungen. Kartoniert DM 3,60. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg.

Obgleich die Bekämpfung der Hausbockplage im großen ganzen wenig aktuelle Probleme aufweist, kann die Vertiefung der Kenntnis der Biologie und der Ökologie dieses Schädlings noch grundsätzlich neue Wege eröffnen. Unter diesem Gesichtspunkt berichtet der Verfasser über seine Untersuchungen in den Jahren 1955 bis 1957. In kurzfristig gelagertem Kiefern- und Fichtenholz schwankt die Entwicklungsdauer des Hausbocks in weiten Grenzen. Zwischen dem Gewichtszuwachs und dem jeweiligen Ausgangsgewicht der verwendeten Larven besteht keine einfache Beziehung: mit steigendem Anfangsgewicht nimmt der Anteil der bis zum Imago in der Zucht gelangenden Tiere zu, aber auch die Zahl der Larven, die im Laufe der Zucht an Gewicht verlieren; die Periode der Gewichtsabnahme kündigt manchmal die baldige Verpuppung an, kann aber auch durch Weiterentwicklung unter neuerlicher Gewichtszunahme abgelöst werden; auch während der „Gewichtsabnahme" werden beträchtliche Holzmengen zerstört. Von 100 etwa 13 bis 26 mg schweren Tieren erreichen kaum 16 ein Gewicht von 400 mg; insgesamt zerstört eine solche Population mehr als 4000 ccm Holzsubstanz.

Fuchs, Göttingen

Statistische Methoden für landwirtschaftliche Versuche

Von Prof. Dr. A. MUDRA

1958. 336 Seiten mit 38 Abbildungen und zahlreichen Tabellen.

Ganzleinen DM 58,60

An Hand zahlreicher Beispiele wird gezeigt, wie sich mit Hilfe von statistischen Methoden Versuche leichter planen, durchführen und auswerten lassen. Nach einer Einführung in die Grundlagen der Statistik wird eine Reihe moderner Versuchsanlagen besprochen, die sich auf den verschiedensten Forschungsgebieten bereits praktisch bewährt haben. Dabei schließt sich der Behandlung jeder Versuchsanlage stets die Darstellung der statistischen Auswertung mit praktischen Beispielen an.

„Der Verfasser hat sich bemüht, in sehr klarer Weise die jeweilige Problemstellung herauszuarbeiten und das Verständnis für die richtige Anwendung der statistischen Arbeitsmethoden zu wecken. An schwierigen Stellen bringt er nicht die Ableitung der Formeln, sondern zeigt ihre Bedeutung und Notwendigkeit sowie ihre Reichweite an einigen Beispielen."

Der Züchter

Die wichtigsten Krankheiten der Kartoffelknollen

Erkennen, Bedeutung und Bekämpfung

Von Prof. Dr. H. BRAUN, Bonn

3., verbesserte Auflage. 1958. 49 Seiten mit 66 Abbildungen.

Kartoniert DM 6,80

Der Verfasser vermittelt mit diesem Buch den gegenwärtigen Stand des Wissens um die Knollenkrankheiten der Kartoffeln. Das eindeutige Erkennen dieser Krankheiten wird durch möglichst erschöpfende und kennzeichnende Beschreibung und durch symptomgetreue bildliche Wiedergabe erleichtert. So werden die verschiedenen parasitären Krankheiten, wie Trocken-, Naß- und Ringfäule, die Pockenkrankheiten, Schorf und Krebs, behandelt. Ebenso erfolgt eine Beschreibung der nichtparasitären Krankheiten.

„Erkennen sowie Bedeutung und Bekämpfung der wichtigsten Krankheiten der Kartoffel sind in diesem Buch übersichtlich und allgemeinverständlich dargestellt. Der Verfasser zeigt in knappen und klaren Worten das, worauf es ankommt. Die vielen gelungenen Abbildungen tragen sehr zur leichteren Verständlichkeit der Fachschrift bei." *Land-Anzeiger*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Handbuch der Pflanzenzüchtung

Begründet von TH. ROEMER und W. RUDORF

2. Auflage in 6 Bänden

Unter Mitwirkung zahlreicher Wissenschaftler und in Gemeinschaft mit den Professoren Dr. H. K. HAYES, St. Paul (USA), und Dr. A. MÜNTZING, Lund (Schweden)

herausgegeben von

Prof. Dr. H. KAPPERT, Berlin, und Prof. Dr. W. RUDORF, Köln-Vogelsang

Soeben erschien:

Band IV: Züchtung der Futterpflanzen

578 Seiten mit 119 Abb. Subskriptionspreis Ganzleinen DM 108,—

Inhalt: Lupinen als Körnerleguminosen und Futterpflanzen · Wicken- (*Vicia*-) Arten Kleeartige Futterpflanzen · Die Gräser

Bisher liegen vollständig vor:

Band I: Grundlagen der Pflanzenzüchtung

872 Seiten mit 175 Abb. Subskriptionspreis Ganzleinen DM 160,—

Dieser Band kann auch einzeln bezogen werden. Einzelpreis DM 192,—

Inhalt: Biologisch-genetische und physiologische Grundlagen der Züchtung Methoden der Züchtung · Biometrie der Pflanzenzüchtung

Band II: Züchtung der Getreidearten

631 Seiten mit 94 Abb. Subskriptionspreis Ganzleinen DM 122,—

Inhalt: Roggen · Mais · Weizen · Gerste · Hafer · Panicum- und Setaria-Hirsen Sorghum and Pearl Millet

Band III: Züchtung der Knollen- und Wurzelfruchtarten

351 Seiten mit 59 Abb. Subskriptionspreis Ganzleinen DM 73,—

Inhalt: Kartoffeln · Beta-Rüben · Brassica-Rüben · Topinambur

Im Erscheinen begriffen:

Band V: **Züchtung der Sonderkulturen**

(Öl-, Eiweiß-, Faser- und Gewürzpflanzen sowie Drogen)

Band VI: **Züchtung von Obst, Gemüse, Reben und Forstpflanzen**

Die jetzt erscheinende Neuauflage dieses internationalen Standardwerkes bringt eine zeitnahe und erschöpfende Darstellung der derzeitigen Kenntnisse auf dem Gebiet der Pflanzenzüchtung zur quantitativen Vermehrung und qualitativen Verbesserung der menschlichen Ernährung, zeigt die Leistungen und Leistungsmöglichkeiten der modernen Pflanzenzüchtung auf und regt somit Praxis und Forschung zu weiterer erfolgreicher Arbeit an. Die große Zahl der Mitarbeiter aus dem Auslande erhöht die Bedeutung des umfassenden Werkes und sichert ihm das Interesse der Hochschullehrer, Forscher und Studierenden des Pflanzenbaues, der Pflanzenzüchtung, der Vererbungslehre und der allgemeinen Biologie sowie der praktisch arbeitenden Pflanzenzüchter, Wirtschaftsberater und Landwirte in aller Welt. Die Originalbeiträge erscheinen in deutscher oder englischer Sprache.

Erscheinungsweise: Die 2. Auflage erscheint in etwa 40 monatlichen Lieferungen, von denen bisher 33 erschienen sind. Die Lieferung umfaßt 5 Bogen zu je 16 Seiten. Ermäßigter Subskriptionspreis der Lieferung DM 13,50, der mit der letzten Lieferung erlischt. Einbanddecken werden am Schluß jedes Bandes ausgegeben und gesondert berechnet. Die Subskription verpflichtet zur Abnahme des Gesamtwerkes.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG